Biotechnology Explorer™

実習用テキスト

Crime Scene Investigator キット

カタログ番号

166-2600JEDU

166-2605JEDU

www.explorer.bio-rad.com

注:
このキットに入っている試薬は法医学的検査のシミュレーションだけのためのものです。
添付されている試薬類を用いても実際の DNA 型分析には使用できません。
また、ヒト由来 DNA は含まれません。

BIO-RAD

DNAの証拠によってどのように犯罪を解明できるのでしょうか?

DNA 鑑定は、分子生物学と遺伝学を応用して DNA サンプルの正確な遺伝子型を決定し、一人の人物を他の人から識別するものです。このパワフルな手法は現在、犯行現場の鑑識や行方不明者、大災害の際の死亡者捜索、人権侵害犯罪捜査や親子関係の解明に世界中で一般的に利用されています。犯罪現場には血液や精液、毛髪、唾液、骨組織、皮膚の破片などの生体由来の証拠になり得るものが残されていることも多く、これらのものから DNA を抽出することができます。犯行現場で得られたサンプル由来の遺伝子型が容疑者の遺伝子型と適合するならば、その容疑者は犯人である可能性が高くなります。二つの遺伝子型が適合しなければ、その人物は容疑者グループからは除外されます。

犯行現場の鑑識ではどのような種類のDNA配列が使われていますか?

いわば 生命の青写真 と言われるゲノムには、ヒトの場合 30 億個にも及ぶ塩基が存在しており、人間同士ではその99.9%以上が共通しています。法医学では、このたった 0.1%の違い、**多型**(「多くの型」)配列が用いられます。その DNA 配列には発現系に関る遺伝子以外の部分、非コード化領域の遺伝子座があり、**ショート・タンデム・リピート**(Short tandem repeats、STRs)の部分を含んでいます。STRs は非常に短い、2～7bp(base pair、塩基対)の繰返しとなっています。下の例(Fig.1)は実際に個人識別のためのDNA鑑定に用いられるTH01として知られる遺伝子座を示しています。この遺伝子座の DNA 配列には[TCAT]配列が 4 回繰り返されています。

… C C C T C A T T C A T T C A T T C A T T CA …

世界中の人達では TH01 に 20 種類以上の対立遺伝子、この場合"[TCAT]の繰返し回数の種類"(Allele、アレル、アリールと言います)が発見されています。染色体は対を成していますから、それに対応する、もう一方の染色体上にもこの遺伝子座があるわけですから、これを組み合わせると理論的には数百通りの対立遺伝子、"繰返し回数の組み合わせ"が存在し、この組み合わせが DNA 型として表現されます。

言うまでもありませんが、私たちは母親から受け継いだ一つと、父親から受け継いだ一つでその組み合わせが作 られるのです。

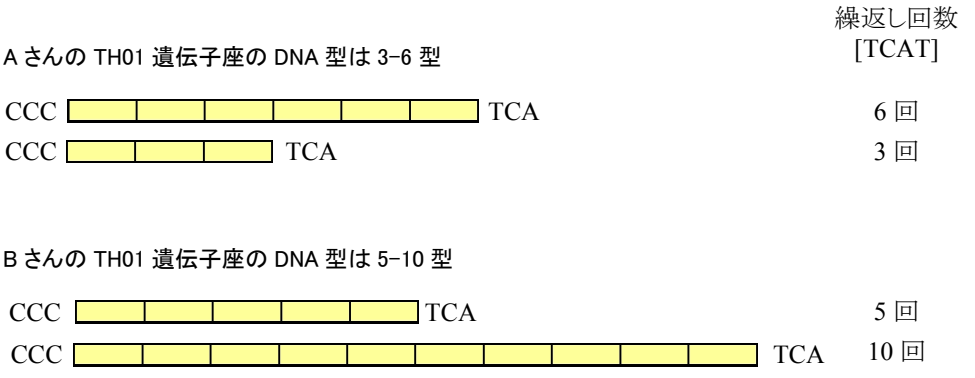


Fig.1 TH01 遺伝子座の DNA 型の例

DNA 型はどのように検出されますか?

DNA 鑑定で重要なポイントは、証拠となるわずかな量の DNA を"鋳型"にして遺伝子座のコピーを**ポリメラーゼ連鎖反応**(PCR)によって増幅することです。目的遺伝子座の両側の DNA 配列に対し、相補的な配列を持ち、その DNA 部分を特異的に認識する DNA 断片、プライマーを PCR には用います。どのような人物であっても、それぞれの相同染色体にある TH01 アレルそれぞれについて、何 10 億という DNA コピーが PCR によって合成されます。このようにして得られたコピ

ーには、最初の鋳型 DNA に存在するのと同じ繰返し回数の STRsが含まれています。STRsが異なると DNA の大きさも異なりますので、アガロースゲル電気泳動法を用いた DNA の大きさによる分離が可能です。既知の TH01 STRsサイズに相当するスタンダードと比較すれば、増幅されたコピーのサイズを決定できます。

このキットは、法医学における DNA 型分析と同じように、遺伝子座位における遺伝子型分析を体験できるようにデザインされています。実際の犯罪捜査では、何種類かの座位でDNA鑑定をおこなって、鑑定結果の識別能力、ある個人を特定する確立を向上させます。例えば、一つの遺伝子座では 1000 人につき一人の違いがわかるかもしれませんが、座位が二つになれば 10,000 人につき一人を識別できるということです。遺伝子型を決定する座位の数が多い方が、識別する能力はよりパワフルになります。

Crime Scene Investigator PCR Basics キットでは、シミュレーションによる TH01 座位における DNA 鑑定の後、さらに米国で実際の法医学的事例作業で用いられている 13 種類の主要な CODIS（Combined DNA Index System）遺伝子座の使用をシミュレーションする追加授業を行うかどうかを教師が選択できるようになっています。この CODIS は FBI が開発したシステムです。この作業自体は簡単ですが、DNA 型分析をする座位の数が多くなるほど、識別能力も高くなるということを実証しており、DNA 鑑定により、親を同じとする子をどのように判別できるかについてを例証します。班ごとに DNA 型のセットを作成し、結果を収集してワークシートに記録し、簡単な統計計算を実施します。

ストラテジー —実験ベースの思考プロセス

このカリキュラムの目的は、実験をベースとした思考プロセスを学生に経験させることです。「ほんのわずかな DNA をどのように使えば 10 億人もの人から 1 個人を識別できるのか」という疑問の解決を通して、学生は PCR、ゲル電気泳動、遺伝子型分析、DNA 型マッチングについて学習します。犯罪捜査に関する DNA 鑑定のシミュレーション、実験や分析の各ステップにおいて、「ここではなぜそうするのか?」といった疑問を生じるかもしれません。そして、進めて行くうちにその回答を見つけていくことでしょう。

重要なことは答えや結果にあるのではなく、その結果はどのようにして得られたのか、そして注意深い観察やそのデータの分析によってどのように証明されたのかにあります。Biotechnology Explorerを使った実験に熱心に取り組むことで、問題を科学的思考で解決することも経験します。学生・生徒用テキストにちりばめられた、“科学的に考える”にポイントをおいた質問は、生徒が実施する実験に多くの関心を持てるよう工夫しました。この過程に学生が興味を持つようになれば、科学的な課題に対して体系的かつ論理的な姿勢で取り組むことの重要性を、より多く理解できるようになるでしょう。

現在、科学の発展は人間の生活、あるいは個人や社会の意思決定のあり方に、すでに影響力を持つようになっています。実験室での体験は生徒の皆様の想像力をかきたてるでしょうし、バイオテクノロジーの背後にある科学の認識と理解を深める事にもなるでしょう。

目次

＜教員用テキスト＞ 1
キットの概要 1
＜授業内容＞ 1
＜実験上の注意＞ 1
＜対象者＞ 2
＜学習内容＞ 2
キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧 4
バックグラウンド 6
＜DNA：生命のブループリント＞ 6
＜PCR－すべてはここから始まった＞ 6
＜PCR とバイオテクノロジー： PCR とは？ なぜ PCR は生物研究を一変させたのか？＞ 7
＜法医学分析の簡単な歴史＞ 7
＜法医学における DNA 鑑定：目に見えない真実＞ 8
＜対立遺伝子頻度と識別能力＞ 8
＜STR 分析は家族関係の解明にも役立ちます＞ 11
実験開始前の準備 13
Lesson 1 PCR の準備 13
Lesson 2 PCR 産物の電気泳動 15
Lesson 3 ゲルの乾燥と DNA パターンの分析 20
このキットを使用するにあたってのポイント 21
Lesson 1 PCR 反応の準備 21
Lesson 2 PCR 産物の電気泳動 23
Lesson 3 ゲルの乾燥と DNA パターンの分析 23
クイックガイド 25
＜学生・生徒用テキスト＞ 27
はじめに 27
＜質問 – はじめに＞ 31
Lesson 1 PCR による増幅 32
＜質問 －Lesson 1＞ … PCR に関する質問 34
Lesson 1 実験手順 35
Lesson 2 PCR 産物の電気泳動 37
＜質問 – Lesson 2＞ 38
Lesson 2 実験手順 39
Lesson 3 ゲルの乾燥と DNA パターンの分析 41
＜質問 – Lesson 3＞ 42
付録 A DNA と PCR について 44
付録 B 科学捜査の歴史概略 51
付録 C STR 対立遺伝子頻度とランダムに適合する確率（RMP）を用いての実習 59
演習 1：STR の遺伝および分析のシミュレーション 59
演習 2：ランダムに適合する確率 62
付録 D PCR と無菌操作 65
付録 E 用語の解説 66
付録 F 先生用回答ガイド 68
付録 G 付録 C 演習問題の解答 72
付録 H 参考文献 74

＜教員用テキスト＞

キットの概要

このキットは、学生が実際に行なわれている法医学的な DNA 鑑定を体験できるようになっています。実験手法と しては PCR、アガロースゲル電気泳動を学習し、それらが DNA 鑑定に利用されていることを知ることができます。生徒は犯行現場の鑑識捜査官として、PCR やアガロースゲル電気泳動を用いて数種類の DNA サンプル ― 仮想上の犯行現場から得られた 1 検体と仮想上の容疑者から得られた 4 検体 ― の遺伝子型を分析します。このキットを使用する際に、50 分授業を数回で行えるようになっています。先生方の都合、生徒や生徒のレベル等に合わせてカリキュラムを組んでください。

また、全ての授業に

- 生徒のための一連の予備考察
- 生徒実験
- 解析に関する質問、および結果の解釈

の 3 つの過程が含まれています。

＜授業内容＞

始めに；事前講義

Lesson 1；ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）反応の準備
　　頬細胞の採取
　　頬細胞サンプルからのゲノム DNA の抽出

Lesson 2；PCR 産物の電気泳動
　　PCR 産物のアガロースゲル電気泳動
　　ゲル染色

Lesson 3；結果の分析と解釈
　　ゲルの脱色
　　結果考察、ディスカッション

Crime Scene Investigator PCR Basics キットには、生徒が PCR を行なうために必要なすべての試薬、プライマー、テンプレート DNA、および Taq ポリメラーゼ等が含まれています。生徒は PCR で DNA を増幅した後、アガロースゲル電気泳動を用いて DNA サンプルを分離し、コントロールとなるアレルラダーを用いて DNA 型を決定します。次に容疑者とされている 4 人の DNA 型と、犯行現場から採取された、犯罪に関与している（犯人？）と思われる人の DNA 型と比較します。この時点では、1 つの遺伝子座位に関して DNA 鑑定を行ないますが、発展授業として、実際の事件、法医学的事例で用いられている 13 種類の遺伝子座の DNA 型を用いた、DNA 鑑定シミュレーションすることもできます。

この作業は簡単ですが、遺伝子型判別をする座位の数が多くなるほど、識別能力も高くなるということを実証しています。さらに DNA 鑑定により、親を同じとする子をどのように判別できるかについてを例証します。班ごとに遺伝子型のセットを作成し、記録を収集してワークシートに記録し、簡単な統計計算を行います。

注：このキットに入っている試薬は法医学的検査のシミュレーション用のものです。実際の DNA 型分析には使用 できませんので、個人の遺伝子型に関する情報が解明されることはありません。また、ヒト由来 DNA は含まれません。

＜実験上の注意＞

当たり前のことですが、実験室内での飲食や化粧直しは厳禁とします。生徒にしっかり認識させましょう。Fast Blast DNA は毒性ではありませんが、染料の取り扱い中はラテックス（アレルギーを持つ人がいるので注意してください）またはビニール製の手袋を着用して手が染まらないようにしてください。白衣は必須ではありませんが、実験をしている、という意識をもたせるためにも可能な場合は着用することをおすすめします。

このキットでは、微少量（1mL 未満の量）の測定にマイクロピペットを使用する必要があります。マイクロピペットの使用が初めての場合は、実験前に練習すると良いでしょう。また、容量可変のマイクロピペットが生徒分揃えられない場合には、安価な容量固定マイクロピペットを使用することも可能です。

＜対象者＞

このキットを使用した授業は、分子生物学または PCR の経験がほとんどまたはまったくない生徒に対し、DNA 鑑定 DNA や PCR、アガロースゲル電気泳動に関して学習するためにも使用できます。しかし、DNA 鑑定や法医学、および統計学に興味のある生徒や学生に、より適しています。このキットを有効に使用するには、以下の概念について生徒や学生が理解しているとより効果的に授業を行うことができます。

・DNA の構造
・DNA 型および DNA 型判別
・遺伝および親から子供への遺伝情報の受け継ぎ
・DNA 複製および PCR
・細胞の構造および核内における DNA の保存
・パターン適合および識別

＜学習内容＞

このキットを使用した授業は 1 時間の授業で完結することができませんが、教科書に出ている内容をテーマ、このキットではDNA鑑定に利用されていることと関連付けて学習する事ができます。そして、得られた実験結果から科学的議論をし、結論を導き出す、という考える事が楽しい、1 時間で終わらない分印象に残る授業を提供することができます。

また、DNA 鑑定のストーリー抜きにして、単に PCR やアガロース電気泳動を学習することも可能ですし、別の背景を仮定した授業も考えられます。他にも方法はあると思いますが、以下のような事柄と関連付けて実験を導入してみてはどうでしょうか？

科学研究
　PCR 及びアガロース電気泳動による DNA 鑑定
　コントロールについて
　実験結果の解釈
　法廷における科学的証拠の採用
生命の化学
　細胞成分の化学的性質
　DNA ゲル電気泳動の原理
　DNA の複製と PCR
遺伝及び分子生物学
　メンデルの遺伝の法則
　非コードが DNA（遺伝子座）について
　STRs
　DNA 鑑定の技法について
生物の体の構想及び機能
　ヒトゲノムの構造
　細胞の構造
進化の生物学
　遺伝子の多様性と個体識別
　遺伝子頻度
　統計と確率

環境科学、健康科学
集団遺伝学
科学技術の役割、社会の中での位置、限界と可能性
遺伝子スクリーニングとデータベース

キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧

このキットの構成物と、キット以外に必要になる試薬・器具等の一覧表です。1 キット＝8 班×4 人分の実験に必要な数になっています。準備の時の確認リストとしてお使いください。

キット内容	キットあたりの数

・PCR モジュール（166-2600JEDU）
-20℃保存：到着時、冷蔵品に含まれますが、到着後冷凍（-20℃）で保存してください。

Crime Scene（犯行現場由来） DNA、250µL	1 本
容疑者 A の DNA、250µL	1 本
容疑者 B の DNA、250µL	1 本
容疑者 C の DNA、250µL	1 本
容疑者 D の DNA、250µL	1 本
マスターミックス、1.2 ml（2x）	1 本
Crime Scene Investigator プライマー（青色）、25µL（50x）	1 本
Crime Scene Investigator アレルラダー、200µL	1 本
オレンジ G ローディングダイ、1 ml（5x）	1 本

室温保存

PCR チューブ、0.2 ml	1 パック
キャップレス PCR チューブアダプター、1.5 ml	1 パック
2.0 ml 各種色つきフリップトップマイクロ遠心チューブ	1 パック

・166-2605JEDU 電気泳動試薬セット付きには以下のものも含まれます。

アガロース（粉末）、25g	1 本
50×TAE、100ml	1 本
Fast Blast^{TM} DNA 染色液、100ml	1 本

キットに含まれない必要な器具等	キットあたりの数

20～200µL 容量可変式マイクロピペット	1 式
2～20µL 容量可変式マイクロピペット 　または 20µL 容積固定式マイクロピペット（166-0513EDU）	1～8 式
2～20µL ピペットチップ	8 ラック
マーカーペン	8 本
蒸留水	約 6L
使用済みピペットチップ等廃棄用容器	1～8 個
クラッシュアイス用のアイスボックス	1～8 個
サーマルサイクラー	1 台
パワーサプライ パワーパック Basic（164-5050JA）	2～4 式
アガロースゲル電気泳動装置 ミニサブセル GT(170-4406JA)	1～8 台
電子レンジ	1 台
200～300ml、500ml または 1L のフラスコ　500ml、1L～のメスシリンダー	
マイクロ遠心チューブ立て	8 個
PCR チューブ立て	8 個

（オプション）

ゲルサポートフィルム（50 枚）－ゲル乾燥用（170-2984）　　8 枚
ゲルのトレースのための透明シート（食品保存用ラップなど）

（参考）このキットが対象としている米国での National Science Standards を示します。

Standard	Fit to Standard
Content Standard A	
Students will develop abilities to do scientific inquiries	Students will perform an experiment using sophisticated procedures Students will apply the results of their experiment to scientific arguments
Students will develop understanding about scientific inquiry	
Content Standard C	
Students will develop an understanding of the molecular basis of heredity	Students will understand that genetic information is passed from parents to children
Content Standard E	
Students will develop an understanding about science and technology studies	Students will perform an experiment using sophisticated procedures, and will gain an understanding of technology as it is used in forensic
Content Standard F	
Students will develop an understanding of science and technology in local, national, and global challenges	Students will learn about how technology is used in identification of victims in disasters, how it is used in the courts, and how technology can be used to reveal familial relationships
Content Standard G	
Students will develop an understanding of science as a human endeavor	Students will work together in teams to achieve a common goal
Students will develop an understanding of the nature of scientific knowledge	Students will perform their own experiments and come to their own conclusions based on their experimental observations

バックグラウンド

＜DNA：生命のブループリント＞

DNAとは生命すべての設計図を導く分子です。私達自身も、あるいは草の葉1本、虫1匹であっても、その体を正確に作るために必要な情報のすべてを DNA の中にコード化して保存しており、体のどの細胞でも DNA は全く同 一です。DNA は、4 種類のヌクレオチドと言う基本的な繰り返し単位で構成されています。細胞の核の中には、23 対、46 本に分かれた DNA が折りたたまれて入っていて、合計すると 30 億個ものヌクレオチドを含んでいます。ある人物の完全なヌクレオチド構成はその人のゲノムと言われます。

2003 年、多くの研究者の共同作業により、ヒトゲノムの全 DNA 配列の解読が完了しました。この偉業の達成には 10 年間もかかっており、またこのプロジェクトには何千人もの研究者が作業に携わっています。注目すべきことは、ゲノム個人差を比較したところ、ほとんどの配列が同一だったのです。実際、およそ 99.9%の DNA 配列は同じで、残りの 0.1%が人々の間の違いを決定していたのです。

DNA は、染色体と呼ばれる、細い糸が長くきつく束ねられたような構造をとっており、細い糸をさらに細かく見ると二重らせん構造の鎖となっています。染色体は様々な長さがあり、その長さはヌクレオチド数で5千万から5億個にまで及びます。ヒトの細胞 1 個 1 個にはその核の中に染色体が 23 対入っています。DNA には遺伝子と呼ばれる、発現系に関る暗号領域があり、この暗号がメッセンジャーRNA（mRNA）に伝わり、 mRNA の情報を元にタンパク質が作られます。ヒトゲノムが解読されると、ヒトの遺伝子はわずか 25,000 弱しかないことがわかりました。ヒトゲノム計画の結果、ヒトのゲノムにコード化されている遺伝子がいかに少なく、効率良く使われているのか、そしていかに多くのゲノムが非コード化配列によって構成されているか、ということが判明しました。こうした非コード化配列の役割の解明はまだこれからです。最近ではこうした配列には、調節やその他の機能があるのではないかと考えられています。

どの細胞でも、その生命が続いていくための 1 つの重要ポイントは、細胞分裂の時、オリジナルの細胞 1 個からまったく同じ娘細胞が2個生まれることです。これが確実におこなわれるようにするために、DNA 複製には高度の特異性と正確性が必要です。DNA 複製に関与する酵素は、既存のらせん鎖にすでに含まれている情報を用いて新しい DNA コピーを作ります。この DNA 複製の基礎― すなわち、テンプレート DNA からまったく同じコピーを作成する ― ということが、1980 年代に開発された技術、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の基本であり、これによって多くの科学領域、医学、そして法廷にも革新がもたらされました。

＜PCRーすべてはここから始まった＞

1983 年、Cetus 社のカリー ミュリスは遺伝子研究に革命を起こす、新たな分子生物学的技術を開発し、それによって 1993 年にノーベル賞を受賞しました。ポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction, PCR）と名付けられたこの技術は、発明後 5 年以内で、分子生物学を多くの分野で用いられる実験手法になりました。PCR が発明される前の分子生物学の実験には手間暇がかかり、高度の技術を要しました。加えて、微量の DNA を用いなければならなかったため、生物学の他の分野（病理学、植物学、動物学、薬学）で働く研究者にとって分子生物学を自分の研究で扱うことが難しくなっていました。

PCR は遺伝子地図作成、クローニング、DNA 配列決定、そして遺伝子検出、という 4 つの主要なバイオテクノロジー分野に影響を及ぼしました。PCR は遺伝病を起しうる特異的な遺伝子変異を見つける医学的な診断法として、或いは犯罪捜査や裁判において容疑者を分子レベルで同定するためにも用いられていますし、ヒトゲノムの配列決定でも重要な技術です。PCR が開発される前は、分子生物学を治療学、法医学、薬学、あるいは医学的診断で用いることは技術的も経済的にも難しいものでした。PCR 技術の発達は、分子生物学を扱いづらい科学から遺伝研究や医学研究でもっとも扱いやすく幅広い分野へと変えたのです。

＜PCR とバイオテクノロジー：PCR とは？ なぜ PCR は生物研究を一変させたのか？＞

PCR の目的は、試験管中で、微量の DNA から、その中の特定の部分を大量に合成することです。技術的には、目的とする配列を含む鋳型 DNA を、決められた方法により酵素で増幅するのです。この鋳型は二本鎖の DNA であればゲノム DNA でも何でもかまいません。研究者は一滴の血液、一つの毛包あるいは頬の細胞から微量の DNA を抽出し、PCR を使って、目的の DNA 断片を数百万個も合成しています。理論的には一つの鋳型があれば数百万個の DNA 分子を合成することができるのです。PCR が開発される前は、このような微量の DNA を用いて法医学的あるいは遺伝的な研究を行なうことはできませんでした。研究者が調べたい、あるいは操作したい DNA 配列を正確に増幅出来るということが、PCR の本当の強みなのです。

PCR による増幅には、鋳型となる DNA 鎖が少なくとも一つは必要です。このキットでは、生徒自身の頬の細胞から抽出されたヒトゲノム DNA が、鋳型 DNA 鎖になります。PCR 反応には次のような反応液が必要になります：

- 4 つの DNA 塩基（アデニン、グアニン、チミン、シトシンのデオキシリボヌクレオチド 3 リン酸化物）
- DNA ポリメラーゼ
- 2 つの DNA プライマー
- 増幅する極少量の鋳型 DNA 鎖

この反応の特異性は、全ゲノムから一つの特異的な DNA（遺伝子）断片に狙いをつけて増幅することによるのです。

特定の DNA 断片の正確なコピーを何百万でも簡単に作れること ― これが実現できたからこそ、現在の法医学にとっても強力な証拠能力を持つ DNA 鑑定を取り入れられるようになったのです。法医学に携わる研究者や検査員はごくわずかな生体試料から、ある人物を DNA 型からかなり高い確率で判定できるようになったのです。

＜法医学分析の簡単な歴史＞

法医学は科学と法律学の間の境界線上にあります。科学は有罪の人に判決を下すのに充分な証拠を提供するのと同様に、冤罪を被っている人の無実の証明をする大きな証拠も提供するのです。実際に、米国では DNA 鑑定の結果、たくさんの人々の無実が証明されたそうです。科学を犯罪捜査に利用したのは、犯行現場を記録する写真が最初でした。指紋を証拠とすることは 100 年以上にわたって利用されています。鑑識作業のために最初に集められた遺伝学的な証拠は、血液型分類を利用したものでした。1980 年代になって初めて DNA を利用した法医学的検査、RFLP 法（Restriction fragment length polymorphism analysis、制限酵素断片長多型、付録 B 参照）が導入されました。RFLP 法には限界がありましたが 20 年近くにわたって法医学分析における頼みの綱となっていました。そして、先に述べた PCR の出現によって初めて、DNA を利用した鑑定方法が飛躍的に発展し、地球上の 2 人の人間を（ただし一卵性双生児は除いて）、その生死には関係なく、識別することが可能となったのです。

＜法医学における DNA 鑑定：目に見えない真実＞

次のような筋書きを考えて見ましょう

現場：あるホテル

ホテルの従業員が大声と女性の叫び声、そして銃声が響き渡るのを聞きます。ある従業員はすぐ窓際に走り寄り、急ぐように走り去るクルマのヘッドライトが小さくなってゆくのを見ます。また、ある従業員は開け放たれた 13 号室のドアのところにかけよると、男性が血溜りの中にうつぶせに倒れているではありませんか！従業員はすぐに 110 番に電話します。数分後、警察が到着し犯行現場の捜査を開始します。これは殺人事件なのでしょうか？

状況からみて、殺人事件のようです。そうなると、犯人は一体誰が…？

科学捜査研究所の鑑識が呼び出されて犯行現場を捜査し証拠を集めます。犯人がこれといった証拠を残して言ったように見えなくても、鑑識が 1 滴の血液や 1 本の毛髪が見つかれば、それが充分な証拠になるのです。見つかった 生物学的証拠 はあなたの所属する科学捜査研究所に運ばれてきます。この証拠は犯人はだれなのか、犯人でなくても、そこにいたのが誰なのか、探し出す有力な手がかりを引き出すことができます。このようなサイエンスフィクションの話が現在は TV ドラマにも登場するようになりました。

現実にこのようなことが世界中で行なわれています。たった 1 個の細胞から、また時には何十年も経った古いサンプルからでも、世界中の国々の法医学研究所で鑑定はいつでもおこなわれています。これが可能なのはその血液や髪の毛に DNA であるからなのです。

日本で DNA 鑑定を実施しているのは科学捜査研究所の鑑識や大学の法医学研究室の研究者などであり、そこにいる法医学の専門家達は完全な DNA を抽出できる生物試料を必要とします。犯行現場に残された試料はきわめて少量しかないので、その量では分析ができないようなことも多くあります。この問題を克服するために法医学スペシャリストは、PCR という、細胞分裂の際に起こる DNA 複製のメカニズムを利用した手法を用いて、充分量 DNA を得るのです。

＜対立遺伝子頻度と識別能力＞

容疑者 A と容疑者 B が三角関係に巻き込まれ、男性をホテルで殺害したと告訴されている、というシナリオを想定してください。実際に銃の引き金を引いた人物が誰なのか、は不明です。犯行現場から得られた DNA サンプルの他に、この法医学者は、容疑者、被害者など DNA を抽出します。その後、PCR で増幅した DNA を、対照（コントロール）となる DNA とともに分析します。実際の分析には遺伝子型分析ソフトウェアを用いて 13 ヶ所の異なった座位における分析をし、識別能力を上げます。その結果を元に誰が事件に関与しているか、という証拠とします。

識別能力を説明するために、ここで容疑者 A と容疑者 B の関与するこの事例をもう一度見てみましょう。この分析に採用した遺伝子座 TH01 には想定される対立遺伝子（アレル）の種類が 12 個あります。たとえば、容疑者 A にはリピート数 6 の対立遺伝子が 1 個、リピート数 3 の対立遺伝子が 1 個あり、TH01 座についての DNA 型は 6-3 となります（次ページ、Fig.2 参照）この図では TCAT のリピートを箱型で示してあります。

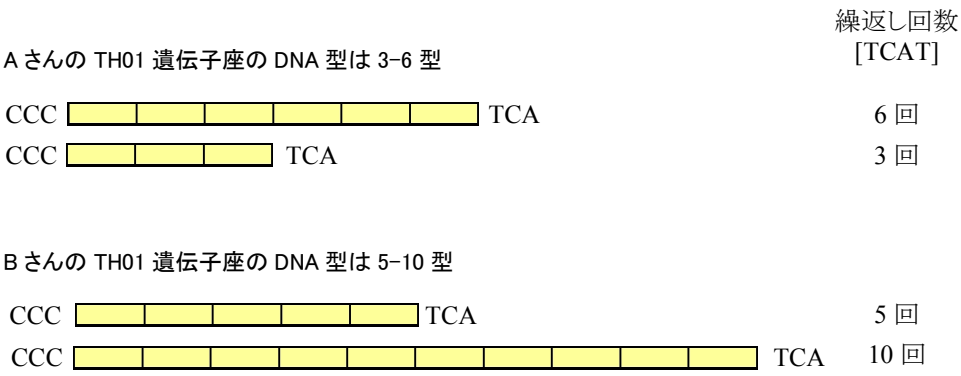


Fig.2 TH01 遺伝子座の DNA 型の例

容疑者 A と容疑者 B の TH01 の DNA 型分析結果の模式図を Fig.3 に示します。この例では、容疑者 2 名から得られた DNA について、TH01 に特異的なプライマーを用いて PCR をおこないました。ゲル電気泳動の後、得られたバンドパターンをアレルラダーと比較して、そのサンプルの DNA 型を特定します。

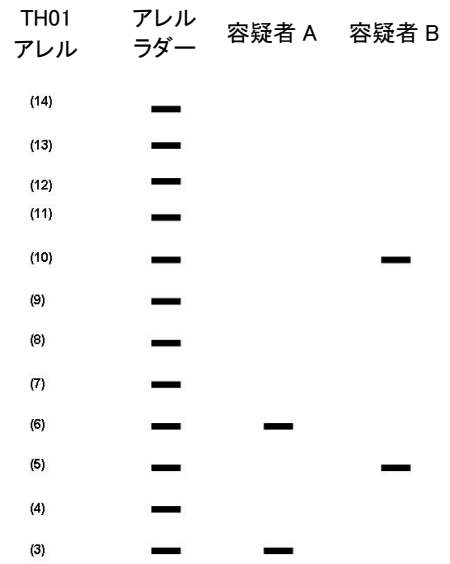


Fig. 3 アガロースゲル電気泳動による分離パターン例

このようにして DNA 型を特定しますが、アレルの出現頻度は人種など、調査対象となる集団によって異なっています。この点を示すために、次のグラフ(Fig.4)を見てみましょう。

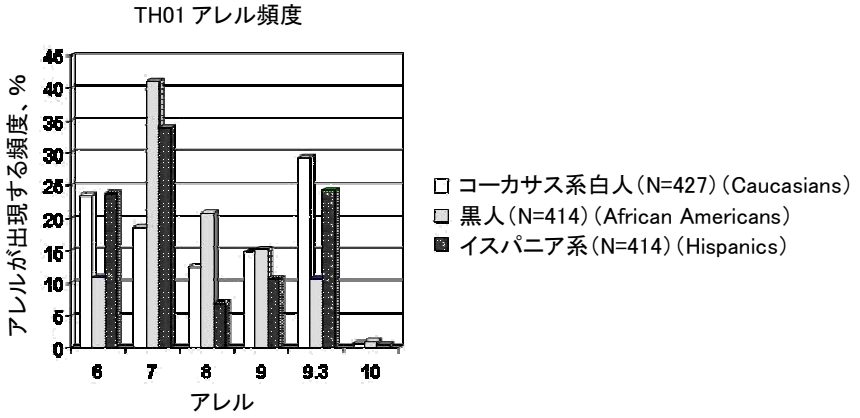


Fig.4 人種における TH01 アレル頻度（米国での例）

Fig.4 の米国における TH01 に関するデータによれば、コーカサス系白人の場合は 6 または 9.3 のアレルが出現する頻度が高く、10 の人はほとんどいません。同様にアフリカ系アメリカ人では 7 のアレルを持つ人が多く、やはり 10 の人はほとんどいません。

メンデルの独立の法則から、各遺伝子頻度を掛け算することで遺伝子型出現頻度が得られます。ここで、D3S1358 という遺伝子座について見てみましょう。D3S 1358 は TH01 のほかに米国の FDI で DNA 鑑定に用いらている座位です。D3S 1358 における容疑者 A の DNA 型は 16-17 型であるとします。それぞれのアレル頻度は白人の場合、

繰返し数 16 のアレル頻度=0.222
繰返し数 17 のアレル頻度=0.222

とします。この座位では、この DNA 型は白人に比較的多く見られ、DNA 型の頻度は

$$(0.222)\times(0.222)=0.0493$$

つまり白人約 500 人に 1 人は 16-17 型であると計算されます。

もし D3S 1358 座位の DNA 型だけで容疑者を特定しようとした時、この 16-17 型が犯行現場からのサンプルから検出されたのであれば、困ったことになってしまいます。約 500 人の白人に1人がこの DNA 型だとすると、容疑者として挙げられてしまう人が多くなってきてしまいます。犯罪捜査には、できるだけ事件に関係のない人を除外することが不可欠な作業となります。

DNA 鑑定では、このような場合どのようにしたらこの作業を進めることができるのでしょうか?

この場合、多くの異なった座位を同時に検討することで問題を解決します。では、D3S 1358 に加えて TH01 の座位も検討してみましょう。

TH01 座では容疑者 A は繰返し数 10 のアレルを 2 つ持っている、DNA 型が 10-10 であったとします。白人の場合、

繰返し数 10 のアレル頻度＝0.008

ですので、DNA 型が 10-10 となる頻度は

$$(0.008)\times(0.008)=0.000064$$

これは白人約 700,000 人に 1 人の割合となります。

以上、2 つの遺伝子座の DNA 型を組み合わせると、

$$(0.0493)\times(0.000064)=0.0000032$$

つまり 300 万人の白人あたり 1 人となるのです。このように、DNA 鑑定を実施する際はいくつかの遺伝子座で DNA 型を組み合わせ、鑑別能力をアップさせます。それが事件に関係ない人を除外し、容疑者を絞っていく証拠になるのです。

Fig. 5 を見てみましょう。犯罪に関っていると思われる容疑者（☆印）が 13 名いるとします。STR 分析によって潜在的容疑者のうち 6 名は TH01 遺伝子型が 6-3 でした。これは犯行現場で検出された遺伝子型です。他の 7 名は TH01 座における遺伝子型が違います。

ですからこの一つのアレルの分析で、容疑者 7 名を除外することができました。しかしまだ可能性のある容疑者が 6 名います。この時点で 6 名全員が犯行現場にいたと結論付けて良いのでしょうか?この質問に答えるには、D3S1358 座についても分析します。ここで容疑者 7 名が D3S 1358 座における DNA 型が 16-17 であることがわかりました。これもまた犯行現場で検出された DNA 型です。この 7 名の容疑者のうち 4 名の TH01 の DNA 型は 6-3 でした。この二つの DNA 型を組み合わせることで、さらに 2 名の容疑者を除外することができ、識別能力がアップしているのが分かります。残り 4 名の容疑者全員が犯行現場にいたのかについては、さらにもう 1 つ、FGA 座についても調べます。犯行現場では 21-23 の DNA 型が検出されているますので、誰がこの DNA 型かを調べます。この場合には容疑者として確保した者のうち 7 名にこの座における遺伝子型があります。しかし TH01 アレルおよび D3S 1358 アレルからの結果を組み合わせれば、容疑者 13 名のうち 1 名が犯行現場に検出されたと同じ遺伝子型であることがわかります。こうした 3 種類の異なった遺伝子座について分析すれば、容疑者 1 名だけを残して他の者は除外することができます。

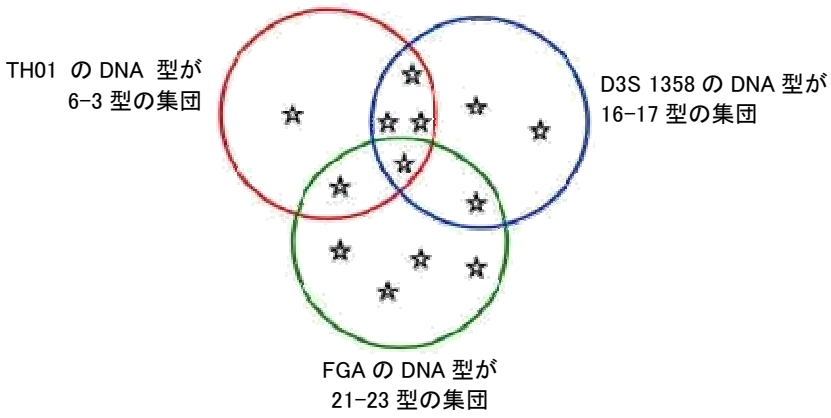


Fig 5. 検討する遺伝子座の数が多いほど識別能力が向上します。

このように、識別能力は解析する遺伝子座や人種によって異なってきます。こうした現象もついても検討していきましょう。付録 B・C でさらに詳しく取り上げていますので参照してください。

＜STR 分析は家族関係の解明にも役立ちます＞

DNA による“証拠”は犯罪解明の他にも、例えば家族関係などの問題解決にも用いられています。前述の例（Fig.3）を考えてみましょう。A と B は何人かの子供の親であると想定してください。父親の方が自然災害で亡くなってしまったとします。父親が死亡した場合には、幸いなことに家族全員がその保険給付金の支払い対象となります。しかし保険会社は一番下の子供（子供 E）に関する医療支出の支払いを拒否しています。なぜなら、この子供はその夫の死亡後に生まれたために、保険会社には誰が父親かについてはその母親の証言しかないからです。その母親は STR 対立遺伝子がそれぞれの親から遺伝することを知っていたことから、母親自身と子供、そして父親から得たサンプルについての STR 分析をしてもらいます。その結果を Fig. 6 に示します。

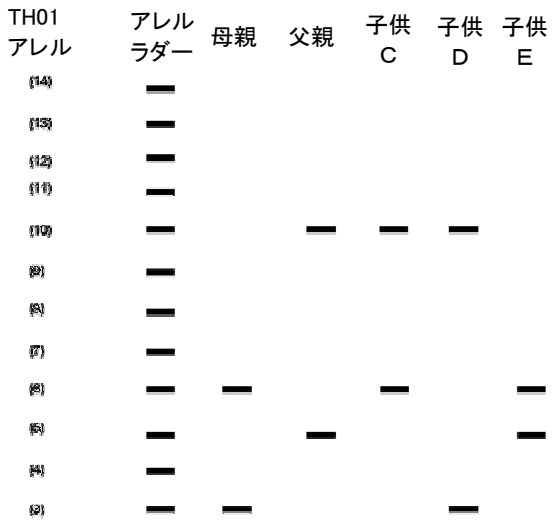


Fig 6. 家族関係の実証に用いられた TH01 アレルの例

この結果から、この座位においては、子供の DNA 型は全て、両親の DNA 型と共通しているアレルを持つことが分かります。つまり、子供 E もこの二人を親とする確立が高くなります。この場合も、実際にはいくつかの遺伝子座について分析します。

実験開始前の準備

◆ 各生徒に準備する実験試薬・器具

実験を始める前に、実験を行う生徒や生徒達のために、次のリストにあるものをすべて用意します。リストは 1 班当たりに必要なものです。このキットには最高、8 班×4 人＝32 人の生徒が実験できる分量が揃っています。あらかじめ 1 つの班の実験スペースに置いておくと良いでしょう。また、マイクロチューブには、間違いのないように印またはラベルをしておくことをお勧めします。

◆ 共有で使用する実験試薬・器具

生徒達が共有して使用する試薬や器具を準備します。これらのものは、先生が使用する実験スペースに置くと良いでしょう。ウォーターバスやインキュベーターは前もって温度調節しておく必要があります。

Lesson 1　PCR の準備

実験準備に必要な試薬・器具のリスト	数量
PCR チューブ	40 本
PCR チューブアダプター	40 本
2.0 ml 各種色付きマイクロチューブ	49 本
マスターミックス	1 本
プライマー（青色溶液）	1 本
犯行現場由来 DNA	1 本
容疑者 A の DNA	1 本
容疑者 B の DNA	1 本
容疑者 C の DNA	1 本
容疑者 D の DNA	1 本
P－1000、P－200、P－20 マイクロピペット	1 本ずつ
P－1000、P－200 用ピペットチップ	1 箱
クラッシュアイス入りボックス	8 個
チューブ立て	8 個
油性マーカーペン	8 本

＜操作手順；約 45 分程度＞

重要！：試薬をマイクロチューブから分注する前には、溶液を良く混ぜるため数回タッピングをし、必ず卓上遠心機で軽く（～3 秒）回転させて内容物を全てチューブの底に集めます（スピンダウン）。特に、冷凍されていた溶液は、溶解したときに成分がチューブ下部に沈んでいますので、混ぜることによって均一な濃度の溶液を分注することができます。また試薬は全て、氷上に置いておきます。

ステップ 1. 各溶液の解凍（約 10 分）

1. マスターミックス、プライマー、証拠 DNA、および各容疑者 DNA を室温で解凍します。
2. 卓上遠心機でスピンダウンし、内容物を全てチューブの底に集めます。チューブは冷凍庫から出した後は氷冷しておきます。

ステップ 2. チューブにラベルをつけます。(約 10 分)

1. 黄色の 2.0ml マイクロチューブ 9 本には「MMP」(マスターミックス＋スプライマー)と表示します。
2. 紫色の 2.0ml マイクロチューブ 8 本には「CS」(Crime Scene、犯行現場由来)と表示します。
3. 緑色の 2.0ml マイクロチューブ 8 本には「A」(容疑者 A)と表示します。
4. 青色の 2.0ml マイクロチューブ 8 本には「B」(容疑者 B)と表示します。
5. オレンジ色の 2.0ml マイクロチューブ 8 本には「C」(容疑者 C)と表示します。
6. ピンク色の 2.0ml マイクロチューブ 8 本には「D」(容疑者 D)と表示します。

ステップ 3. マスターミックスとプライマー(MMP)の準備(約 10 分)

注:プライマーとマスターミックスは小分けする前に卓上遠心機にかけて溶液がチューブの上フタに付いていない状態にしてください。

マスターミックスとプライマーの調整は実習が始まる前 1 時間以内に行います。

1. MMP と表示したチューブのうち 1 本にマスターミックス 1,000µl を加えます。
2. プライマー20µl を同じ MMP チューブに加えます。
3. 充分に混合してから卓上遠心機を使ってスピンダウンします。この溶液は青色をしています。必ず氷冷しておきます。

ステップ 4. 試薬の分注(約 15 分)

注:マイクロチューブは全て、チューブ立てに入れ、フロートごと氷冷しておきます。

1. ステップ 3 で調整した黄色チューブ MMP(マスターミックス 1,000µl＋プライマー20µl)から 120µl を取り、 MMP と表示した黄色いチューブ残り 8 本に分注します。
2. 犯行現場由来 DNA 25µl を「CS」と表示した紫色のチューブ 8 本に加えます。
3. 容疑者 A の DNA 25µl を「A」と表示した緑色のチューブ 8 本に加えます。
4. 容疑者 B の DNA 25µl を「B」と表示した青色のチューブ 8 本に加えます。
5. 容疑者 C の DNA 25µl を「C」と表示したオレンジ色のチューブ 8 本に加えます。
6. 容疑者 D の DNA 25µl を「D」と表示したピンク色のチューブ 8 本に加えます。

ステップ 5. DNA を加えたチューブを 1 本ずつ、チューブ立てを用いて各班のアイスボックスに入れます。

ステップ 6. 下記の「**実験前に準備すべき試薬・機器のリスト**」にあるものを生徒用実験台に必要なものを準備します。(約 15 分)

ステップ 7. サーマルサイクラーにプログラムを入力します。

詳細な使用方法については、それぞれの機種の取扱説明書をご覧ください。

ステップ	意味	温度	時間	サイクル数
	変性	94℃	2 分	1 回
温度サイクル	変性	94℃	30 秒	35 回
	アニーリング	52℃	30 秒	
	伸長	72℃	1 分	
最後の伸長反応	伸長	72℃	10 分	1 回

＜生徒用実験台に事前に準備するもの＞

実験前に準備すべき試薬・機器のリスト	数量
MMP（青色の液体）	1本
犯行現場由来 DNA（紫色表示チューブ）	1 本
容疑者 A の DNA（緑色表示チューブ）	1 本
容疑者 B の DNA（青色表示チューブ）	1 本
容疑者 C の DNA（オレンジ色表示チューブ）	1 本
容疑者 D の DNA（ピンク色表示チューブ）	1 本
PCR チューブ	5 本
PCR アダプター	5 本
チューブ立て	1 個
油性マーカーペン	1 本
P－20 マイクロピペット	1 本
2～20μl フィルター付きピペットチップ	1 箱

Lesson 2 PCR 産物の電気泳動

この実験では塩基対の数が 200～1000 個程度の小さな DNA 断片が得られます。これらを適切に分離するにはアガロースゲルが必要です。このサイズの DNA 断片を 3%アガロースゲルで電気泳動することで最適な分離と解像度を得ることができます。

実験準備に必要な試薬・器具のリスト	数量
オレンジ G ローディングダイ	1 本
アレルラダー	1 本
1.5 ml マイクロチューブ	16 本
P－200 マイクロピペット	1 本
P－200 用ピペットチップ	1 本
P－20 マイクロピペット	8 本
P－20 用フィルター付きピペットチップ	8 本
Fast Blast DNA 染色液	1 本
フラスコまたはビン（希釈後の Fast Blast を保存する）	1 本
蒸留水	3.5L

ゲル染色用のトレー	1～8 個
パワーサプライ	2～4 台
電気泳動用材料および装置	下記参照

＜操作手順;1－3 時間＞

ステップ 1. 試薬の分注（最大約 20 分）

1. オレンジ G ローディングダイおよびアレルラダーを解凍し、卓上遠心機でスピンダウンします。
2. オレンジ G ローディングダイ 50µl をアレルラダーに加えます。これによってオレンジ G アレルラダーができます。充分に混合して卓上遠心機でスピンダウンして内容物をチューブの底に集めます。
3. マイクロチューブにラベルします。
   ・マイクロチューブ 8 本に「LD」と書きます。（オレンジ G ローディングダイ用チューブ）
   ・マイクロチューブ 8 本に「ラダー」と書きます。（オレンジ G アレルラダー用チューブ）
4. オレンジ G ローディングダイ 60µl を「LD」と表示したチューブ 8 本に分注します。

   この状態で 4℃で 2 週間まで保存できます。
5. 上記 2.で調製したオレンジ G アレルラダーを「ラダー」と表示したチューブ 8 本に 25µl ずつ分注します。4℃で 2 週間まで保存できます。

   注: 上記5. で分注したオレンジ G アレルラダーは 4.で分注したオレンジ G ローディングダイだけのものと区別がつき難いです。アレルラダーを配布する際は、生徒が電気泳動用ゲルの準備ができてからアレルラダーを配布すると生徒が間違いを起こし難くなります。

ステップ 2. ゲル、泳動用バッファー、および電気泳動装置の準備

アガロースゲルの調製については次ページ「**アガロースゲルおよび電気泳動用 TAE バッファーを調製する**」をご覧ください。（約 30 分-1 時間）

ステップ 3. Fast Blast DNA 染色液を調製します。

染色については「**Fast Blast DNA 染色液の調製**」を参考にしてください。（約 15 分）

ステップ 4. 下記の「**実験前に準備すべき試薬・機器のリスト**」にあるものを生徒用実験台に必要なものを準備します。（約 15 分）

＜生徒用実験台に事前に準備するもの＞

実験前に準備すべき試薬・機器のリスト	数量
3%アガロースゲル（下記参照）	1 枚
Lesson 1 で得た PCR 産物	計 5 本
犯行現場由来 DNA	1 本
容疑者 A の DNA	1 本
容疑者 B の DNA	1 本
容疑者 C の DNA	1 本

容疑者 D の DNA	1 本
電気泳動用バッファー	300～350 ml
オレンジ G ローディングダイ	1 本
オレンジ G アレルラダー	1 本
P-20 マイクロピペット	1 本
P-20 用フィルター付きピペットチップ	1 箱
電気泳動槽	1 台
パワーサプライ	～1 台
Fast Blast DNA 染色液（実験台で共有）	1
ゲル染色用トレー	1

＜アガロースゲルおよび電気泳動用 TAE バッファーを調製する＞

アガロースゲルや TAE バッファーは、先生が 1～2 日前にあらかじめ準備しておくことも、または生徒がグループごとに授業中に調製することもできます。（約 30 分～1 時間）

実験前に準備すべき試薬・機器のリスト	数量
アガロース	10.5 g
50 倍濃度の TAE	60 ml
メスシリンダー、3L および 500 ml	2 つ
電子レンジ、 またはホットプレートマグネチックスターラーとスターラーバー	1 セット
フラスコ、1L	1 つ
フラスコ、50 ml	1 つ
60℃のウォーターバス	1 台
ゲルキャスト用トレー	4～8 枚
ゲル用のコーム	8 枚
セロファンテープ	1 つ
水平型電気泳動槽	4～8 台

ステップ 1. 電気泳動用バッファーを調製します。（約 10 分）

TAEバッファーは50倍濃度溶液としてキットに添付されています。アガロースゲルの作成に使用する他に、電気泳動槽 1 台につき、およそ 275～300ml の 1×TAE バッファーが必要です。8 台分の電気泳動槽および 8 枚のアガロースゲル作成するにはおよそ 1×TAE バッファーが 3L 必要です。

50×TAE から 1×TAE を 3L 調製するためには、蒸留水 2.94L に 50×TAE 60ml を加え、良く混合します。

ステップ 2. アガロース溶液を作製します。（約 10 分）

1. アガロースの準備

本実験で推奨するゲル濃度は、3.0%アガロースです。ゲルの厚さは 0.75～1.0 cm です。このゲル濃度は解像度に優れ、電気泳動で DNA 断片を分離する場合の泳動時間が最小で済みます。アガロース 3.0g を 100ml の 1×TAE バッファーに加えると3.0%溶液を調製することができます。ゲル 8 枚分には、3.0%アガロース溶液が約 350ml 必要です（1 倍濃度 TAE バッファー350ml あたりアガロースは 10.5g となります）。アガロース溶解には必ず 1×TAE バッファーを使用してください。水は絶対に使用しないでください。

2. 容器

適当な容器（例えば、250mlの三角フラスコ、メディウム瓶など）を用意します。沸騰時の事故防止や、アガロースの溶解時間を考慮すると、使用する容器は、一度に調製する液体容量の 2 倍以上の容量を有する容器が必要です。例えば、アガロース 100ml を調製するときは 200～300ml フラスコを使用してください。容器にアガロース粉末を入れ、1×TAEバッファーを適正量加えて懸濁します。ホットプレートマグネチックスターラーあるいは電子レンジでアガロースを溶解する ことができます。アガロース粉末が完全に溶解してしまうまで、煮沸します。状況に応じて2～3 回に分けて調製すると良いでしょう。

3. アガロースの溶解

警告！:アガロースゲルを調製および注入する場合は、常にグローブ、ゴーグル、および実験衣を着用してください。沸騰したアガロース、あるいは熱いアガロース入り容器が皮膚に接触すると、重度のやけどの原因になる恐れがあります。また、溶液の突沸には十分注意してください。

電子レンジを使用する方法:

ゲル溶液を電子レンジに入れます。フタ付ビンを使用している場合はフタを緩めます。加熱設定を「中」にし、加熱時間を 5 分に設定します。30 秒ごとに、あるいは溶液が沸騰しそうになったら電子レンジを止め、フラスコを実験台上で水平に、ゆっくりと振って溶け残っているアガロースを懸濁させます。

これが最も早く、最も安全なアガロース溶解法です。小さな半透明のアガロース粒子が完全に溶解するまで、煮沸と振とうを繰り返します。加熱中は必ず電子レンジの中にある**フラスコ内の溶液が突沸しないように、加熱中は常に目で見ながら注意してください。**アガロースゲルが完全に溶解したら、ゲルトレーに注ぐまで小さなフラスコでフタをしたまま 60℃（手で触れられる程度）に冷まします。

ホットプレートマグネチックスターラーを使用する方法:

溶解していないゲル液にスターラーバーを入れます。ホットプレートマグネチックスターラーで攪拌しながら沸騰するまで溶液を加熱します。小さな半透明のアガロース粒子が完全に溶解するまで煮沸を繰り返します。ゲルトレーに注ぐまで、アルミ箔等でフタをしたまま 60℃（手で触られる程度）に冷まします。加熱中は、**フラスコ内で突沸が起こらないよう、常に目で見ながら注意してください。**

ステップ 3. ゲルの作製（約 10 分）

上記の指示通りにアガロースを調製し、クラスあたりのアガロースの必要量を決定してください。ゲル用コームの歯を覆い、およそ 0.75～1.0cm の深さになるまでアガロースを注ぎます。ゲルの厚さが 0.75～1.0cm になるようにトレーに印をつけておいてもよいでしょう。ゲルが固まるまではゲルトレーを動したり、触ったりしないでください。なお、この実験で扱うゲルはアガロースの濃度が高いため、すぐに固まってしまいます。取り扱いに注意してください。

ゲルが固まったら、ジッパー付き保存袋や保存用タッパーに入れ、翌日に使用するまで室温あるいは冷蔵庫に保管します。授業中に生徒にゲルを作成させる場合、クラス全体がゲルを流し終わるまで約 30 分はかかります。できれば予備のゲルを 1～2 枚作成しておくとよいでしょう。ここでは、アガロース溶液を流し込む場合にゲルトレーをテープで止める方法を簡単に説明します。その他の方法はサブセル®GT 取扱説明書に詳述されています。

1. ゲルトレーの端をセロハンテープでしっかり目張りします。液体状のゲルがもれないように、ゲルトレーの端に、ピンと張った状態でテープをとめます。

2. 水平台あるいは実験台上に水準器を置き、水平を確かめた後にゲルトレーをおきます。

3. 1×TAE バッファーに溶解したアガロースを、必要な濃度と量で調製します。

4. 流し込む前に 60℃まで冷まします。

5. アガロースを 60℃まで冷ましている間に、ゲルトレーの適当な溝にコームを置きます。コームはゲルトレーの端から 3/4 インチ（約 1.9cm）以内に置いてください（ゲル中央には置かないでください）。

6. ゲルを室温に 10～20 分置いて固まるのを待ちます。使用できるようになると白く濁って（不透明に）みえるようになります。

7. 固まったゲルから慎重にコームを取り外します。真上にそっと持ち上げるように抜くとうまくいきます。

8. ゲルトレー端のテープをはがします。

9. サンプルウェルが陰極側（黒色）になるように、水平設置した DNA 電気泳動槽にゲルトレーを置きます。泳動を行うと、DNA サンプルは陽極（赤色）方向に向かって移動します。

10. ゲルの表面より 2mm 程度上に来るまで、1 倍濃度の TAE 泳動バッファーを電気泳動槽に満たします。

11. 生徒用説明書の指示に従ってゲルにサンプルを加えます。

12. 100V で 30 分間泳動します。オレンジ色素の線がゲルの外に流れ出てしまうと過剰に泳動している状態になってしまいます。泳動し過ぎないようにないようご注意ください。

13. ゲルを Fast Blast DNA 染色液で染色します（下記参照）。

＜ Fast Blast DNA 染色液の調製（所要時間 10 分）＞

染色液するために、ゲルをゲルトレーから外します。サンプルウェルの列に沿ってゲルが裂ける場合があるので、ゲルのサンプルウェル部分を支えるなど、特別の注意を払う必要があります。ゲルはエチジウムブロマイドや SyberGreen 等蛍光染色剤で染色し、UV 光を当ててバンドを検出することも可能です（キットには含まれていません）。エチジウムブロマイドを用いるときは、アガロース中に 0.05μg/ml のエチジウムブロマイドが含まれるようにしてください。この濃度のエチジウムブロマイドで最もきれいなコントラストのバンドが見えます。ただし、エチジウムブロマイドは発ガン性物質ですので取扱に注意ください。

注:Fast Blast 染色液はエチジウムブロマイド染色を打ち消してしまうので、多重染色する際はエチジウムブロマイド染色は Fast Blast 染色の前に行ってください。

染色方法には、一晩染色を行うオーバーナイトステインと染色時間が 1～2 時間のクイックステインの2種類があります。授業の時間割等に合わせてお選びください。

ステップ 1. 染色液を調整します。（約 10 分）

1. 適当な大きさのフラスコを使用し、
   オーバーナイトステインの場合、Fast Blast 染色液 1ml を蒸留水 499ml で希釈します。
   クイックステインの場合、Fast Blast 染色液 100ml を蒸留水 400ml で希釈します。

2. フラスコの口を食品保存用ラップ等で覆い、使用するまで室温で保管します。7cm 平方のゲルを染めるのに必要な Fast Blast 染色液は 60ml～100ml 程度（ゲルの厚さにより変わります）になります。

ゲルの染色は実験台に 1 つずつ割り当てられた染色トレーで行いますが、大きい染色皿を用いて一度にたくさん染色してもよいでしょう。また、振盪機などでゲルを軽く振ると効率良く染まります。この色素は無毒ですが、手が染まらないようにするために、ゲルを扱う時はラテックス製あるいはビニール製の手袋を使用してください。また実験着またはその他保護衣を着用して衣類を汚さないようにします。染色溶液を廃棄する場合には施設の規則に従って廃棄してください。Fast Blast が衣類等に付着した場合には 10%漂白剤溶液または 70%アルコールをご利用になればほとんどの場合除去することがきでます。ご利用になる漂白剤が衣類にダメージを与えないことを事前にご確認ください。

ステップ 2. ゲル染色・脱色（約 10 分）

オーバーナイトステインによる染色手順

1. 非金属製のへら等を使用してゲルトレーからゲルを外します。サンプルウェルの列に沿ってゲルが裂ける場合があるので、ゲルのサンプルウェル部分を支えるなど、特別の注意を払う必要があります。

2. ゲルを完全に覆いきるまで 1×Fast Blast DNA 染色液を注ぎます。食品保存用ラップで覆い乾燥を防ぎ、一晩染色します。

3. 翌日、蒸留水でゲルを数回すすぎ、ゲルの背景部分の染色を落とします（脱色）。

クイックステインによる染色手順

1. 100 倍希釈の Fast Blast DNA 染色液を用意し、ゲルの入った染色トレーに約 60ml 入れます。染色トレーを食品保存用ラップで覆い、5 分置いて染色します。

2. Fast Blast DNA 染色液をバイアルあるいは適切な容器に入れ、およそ 100ml の温水（40～55℃）(温めた精製水)を注いでゲルを約 10 秒間すすぎます。

3. 100ml の温水を容器に注ぎ、5 分間置きます。この時、振盪器などで容器を軽く揺らしてやると、ゲルから余分な染色剤が抜けやすくなります。使用した精製水は廃液用ビーカーに注ぎ捨てます。これを 3 回繰り返します。

4. 必要であれば希望するコントラストになるまで温水で脱色を続けます。

Lesson 3 ゲルの乾燥と DNA パターンの分析

ゲルを乾燥させる前に記録をとっておくとよいでしょう。紙または透明なシートにゲルの輪郭、サンプルウェル、および DNA バンドを書き写すか、あるいはカメラで写真を撮影するなどの方法でゲルが乾燥する前に結果を得ることができます。

このキットを使用するにあたってのポイント

このセクションでは、技術的に難しいこと、あるいは実験の結果と理解に非常に重要な意味を持つ手順について述べてあります。また、付録 D にPCR や無菌操作の基礎的な注意事項がありますので参照ください。先生は、生徒に対して、これらのポイントに充分注意するよう指導してください。

そして、できれば生徒がその手技を行なう前に、デモンストレーションをしてください。

学生・生徒用テキストとクイックガイドには、各 Lesson で用いる全ての実験ステップと手法に関する細かい記述と挿絵が含まれています。実習で使う実験手順の質問に関しては、そちらを参照下さい。

Lesson 1　PCR 反応の準備

＜コンタミネーションについて＞

生徒には実験の段階ごとに新しいピペットチップを使用し、またチューブ類は試薬をすぐに加えない場合には必ずフタをしておくなど、コンタミネーションを防ぐための指導しておく必要があります。作業環境の整備についての詳しい説明は付録 D をご参照ください。

＜マスターミックスとは？＞

マスターミックスはヌクレオチド（dNTPs（dATP、dTTP、dCTP、dGTP））、バッファー、Taq DNA ポリメラーゼの混合物であり、これらは PCR 反応に必須の要素です。実験直前にプライマーをマスターミックスに加えて、マスターミックスを完成させます。DNA テンプレート 20µl に完成後のマスターミックス 20µl を加えた時点で、40□l の PCR 反応に必要な成分がすべて含まれています。

2 倍濃度のマスターミックスには 0.05 U/µl の Taq ポリメラーゼ、3 mM の $MgCl_2$、1.6 mM の dNTPs およびプライマーが 1µM ずつ含まれています。プライマー、マスターミックスおよび DNA テンプレートを混合した後の PCR チューブ内は 1 倍濃度になります。このチューブに含まれるのは、0.025 U/µl の Taq ポリメラーゼ、1.5 mM の $MgCl_2$、0.8mM の dNTPs および各プライマーが 0.5µM となります。

＜準備した PCR 反応液はどの程度安定なのでしょうか?＞

PCR の前にマスターミックスと DNA を放置しすぎると増幅効率が低下します。従って、2 つのクラスの授業を 1 台の PCR 装置で行う場合、またはチューブの数が手持ちのサーマルサイクラーにセット可能なチューブの本数よりも多い場合など、調整後 PCR を行うまで時間が開いてしまう時は、1 時間以内であれば反応液を氷冷しておくことができます。マスターミックスは必要に応じてマイクロチューブに小分けして、授業のたびに必要な量だけ解凍して使うようにしてください。

＜プライマーとは何でしょうか？ どうして必要なのでしょうか?＞

プライマー（オリゴヌクレオチド）とは、短い DNA 鎖であり、通常はヌクレオチド 3～30 個分の長さで、PCR を用いて複製したいと思うテンプレート（鋳型）に対して相補的になっています。DNA はそれ自体では新しい DNA 鎖を作製できないためにプライマーが必要となります。DNA はヌクレオチドを付加して伸長するきっかけとして、すでに存在しているヌクレオチド鎖（つまりプライマー）を必要とします。言い換えればこうした短い DNA 鎖が DNA 合成反応の「導火線」となるのです。DNA ポリメラーゼが 1 本鎖の DNA 鋳型とプライマーの結合体を認識し DNA の伸長反応を行います。この過程についの詳しい内容については付録 A をご参照ください。

＜プライマーはなぜ青いのでしょうか?＞

プライマーミックスには PCR を阻害しない色素（キシレンシアノール）が含まれており、これによって生徒はマスターミックスとプライマー混合物を、PCR 反応のテンプレートに混ぜたことを視覚的に簡単に見分けられるようになっています。この色素はゲル内でも移動するのでゲル電気泳動でも見分がつけやすくなっています。

＜サーマルサイクラーを使って行う PCR＞

PCR による増幅は、サーマルサイクラーでの加熱と冷却の交互の反応サイクルによっておこなわれます。今回のこの実験では 3 段階のサイクルを採用しています。

DNA はまず 94℃に 30 秒間さらされることで変性が起き、52℃で 30 秒間のアニーリングを経て、72℃で 1 分間の DNA 鎖の伸長がおこなわれます（Fig.7）。このサイクルは PCR 増幅中に 35 回繰り返されます。変性段階では DNA テンプレートの 2 本鎖が分かれて PCR プライマーおよび Taq DNA ポリメラーゼが近づけるようになります。アニーリングの段階では PCR プライマーは DNA テンプレートの相補的領域を認識して DNA に結合します。プライマーが結合すると Taq DNA ポリメラーゼはプライマーを 5'から 3'の方向に伸長し、この伸長合成中に DNA 断片が複製されます。PCR 反応は完了するまで約 1.5 時間かかります。

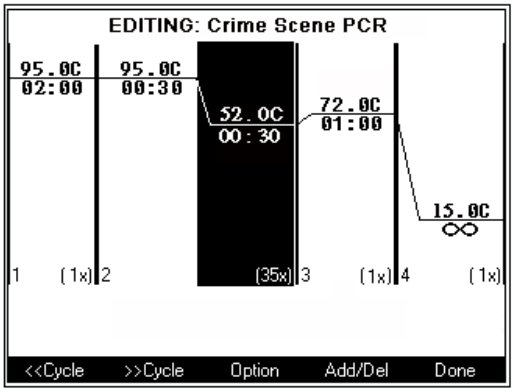


Fig.7.　PCR の操作画面例

PCR チューブはとても小さいため、取扱には注意が必要です。チューブをサーマルサイクラーに入れる前に完全にチューブのフタが閉まっていることを確認することが重要です。チューブのフタが完全に閉まっていないと、内容物が蒸発して反応液中の塩濃度が濃縮されて PCR 反応が妨害されてしまいます。

バイオ・ラッドのサーマルサイクラーはオイルを使用する必要はありません。ブロックウェルにもサンプルチューブにもオイルは必要ありません。ブロックウェルの形状は最も標準的な 200μl の薄壁 PCR チューブと均一に接触できるようになっています。サーマルサイクリングのプログラム実行中は、サンプルブロックカバーが加熱されて、常にサンプルブロックより高い温度に維持されます。これによって水蒸気がサンプルチューブのキャップの下に凝縮しないようになっており、サンプルの蒸散が抑えられるのでチューブ内にオイルを加える必要がないのです。

＜手動で行う PCR＞

オートサーマルサイクラーを使用せずに PCR をマニュアルで実行することも可能です。マニュアルでの PCR では、ネジ式キャップのついたチューブを使用し、蒸散を防ぐためにミネラルオイルをチューブ内に 1 滴たらしておかなければなりません。チューブを 94℃に設定した加熱ブロックまたはウォーターバスに 30 秒間置き、次に手動で移動して 52℃に設定した加熱ブロックまたはウォーターバスに 30 秒間置き、最後に 72℃に設定した加熱ブロックまたはウォーターバスに移して 1 分間置きます。マニュアルで PCR を 35 サイクルおこなうのにかかる時間は 150 分程度です。作業は大変ですが、PCR は可能です。

Lesson 2　PCR 産物の電気泳動

＜オレンジ G ローディングダイ＞

PCR 後のサンプルを電気泳動にかける前に、生徒は各 PCR チューブに 5 倍濃度のオレンジ G ローディングダイを 10 μl 加えます。この時先生もすでにオレンジGローディングダイをアレルラダーに加えて準備してあるはずです。オレンジG DNA ローディングダイにはグリセロールが含まれているため、サンプルの密度が増加してアガロースゲルのウェルに必ず沈むようになっています。このオレンジ G ローディングダイには 50bp の DNA と同じ速度で陽極に向かって同時に移動するオレンジ G と呼ばれる色素が含まれています。オレンジ G 色素はどの DNA バンドにも重なったり、隠してしまったりすることもなくゲル内の部分を移動することから、この種の実験によく使用されています。

＜色素の移動＞

オレンジ色素が過剰泳動によってゲルから出てしまうと、サンプルによってはゲルの外に流れ出てしまっている場合があります。プライマーの着色に使っている色素（キシレンシアノール）は、オレンジ G とは相対的な電荷の違いがあるために移動速度も異なっており、電気泳動の移動度の指標マーカーとして利用できます。

＜ゲルの染色にエチジウムブロマイドを使ってもいいのでしょうか?＞

本キットは、安全で毒性のない DNA 色素である Fast Blast DNA 染色液を使うように最適化されています。エチジウムブロマイドは DNA の可視化によく用いられている染色液であり、感度は Fast Blast より高いので、本キットでゲルの染色に使っても良好な結果が出るでしょう。しかしエチジウムブロマイドは既知の変異原物質かつ発がん性が疑われている物質でもあり、また DNA の可視化には UV 光源を必要とします。エチジウムを使用する場合には、高感度であるためにプライマーダイマーが Fast Blast を使ったときよりもはっきり現れてしまいます。生徒に結果の解釈をさせるにあたって、経験の少ない生徒を混乱させてしまうことが考えられます。エチジウムブロマイドを染色に用いた場合、ゲルにはアガロース 1ml あたりエチジウムブロマイドを 0.05 μg 含まなくてはなりません。エチジウムブロマイドはこの濃度であればバンドをはっきりとしたコントラストで見ることができます。

注意：Fast Blast DNA 染色液はエチジウムブロマイドの染色を抑制するので、エチジウムブロマイドで可視化する場合には、Fast Blast DNA 染色液を使う前に使用してください。

Lesson 3　ゲルの乾燥と DNA パターンの分析

＜アレルラダー＞

キットに入っているアレルラダーは、今回の実験で想定される全対立遺伝子を示しています。アレルラダーには塩基対長 1,500、1,000、700、500、400、300、200 および 100bp の 8 本のバンドが含まれています。これらの対立遺伝子は上から下に向かって順に 15 番、10 番、7 番、5 番、4 番、3 番、2 番および 1 番とされています（Fig.8 のゲル参照）。Fast Blast DNA 染色液を使ってオーバーナイトでの染色をする場合には、細い方のバンド（100bp と 200bp）がぼんやりすることもあります。これはゲル内での DNA の拡散によるものです。これを避けるためにゲルの染色時間を短縮する方がよい場合もあります。アガロースゲルが 3%と高濃度である場合には、1 倍濃度の Fast Blast DNA 染色液中にゲルを数時間置くだけで適切な染色を得ることも可能です。ゲルを染色液中に 2－3 日間放置しないでください。拡散が起こり、結果の正確な解釈ができなくなる可能性があります。

＜DNA サンプルと一致するアレルラダーからサンプルの遺伝子型を特定する方法＞

ある DNA サンプル中の対立遺伝子を特定するには、DNA サンプルから増幅した PCR 産物の移動度をアレルラダーと比較して、PCR 産物のどのバンドが適合するかを調べます。サイズが一致したアレルラダーの各対立遺伝子の正体（名称）が、検査している容疑者の各対立遺伝子の正体（名称）に該当します。各 DNA サンプルからは、2 つの対立遺伝子を示す 2 本のバンドが現れます。容疑者のサンプルの遺伝子型を特定するには、DNA サンプルごとにバンドサイズが一致するかどうかの確認を繰り返します。どの遺伝子型も 2 つの対立遺伝子の組み合わせとなるはずです。

下図はキットで実験した場合に見られる代表的な結果を示しています。

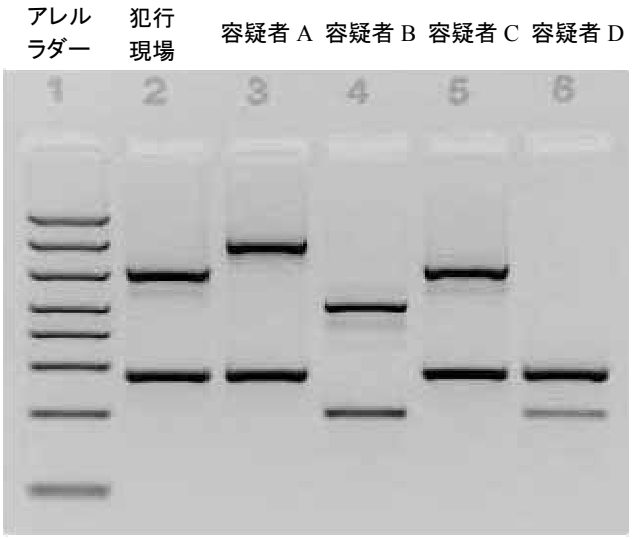


Fig.8. Crime Scene Investigator PCR Basics キットによる PCR 増幅、ゲル電気泳動および
ゲル染色後の代表的な結果

レーン 2 のサンプル、つまり犯行現場の DNA には、7 番と 3 番の 2 つの対立遺伝子があります。犯行現場の DNA の遺伝子型は 7-3（または 3-7）となります。次のサンプルの遺伝子型は 10-3、その次のサンプルでは 5-2、と続きます。特定された対立遺伝子と導かれた遺伝子型をまとめると次のような表になります。

ゲルのレーン	DNA サンプル	遺伝子型（特定された対立遺伝子）
1	アレルラダー	
2	犯行現場由来	7－3 型（繰返し数 7 と 3）
3	容疑者 A	10－3 型（繰返し数 10 と 3）
4	容疑者 B	5－2 型（繰返し数 5 と 2）
5	容疑者 C	7－3 型（繰返し数 7 と 3）
6	容疑者 D	3－2 型（繰返し数 3 と 2）

この実験の最終目標は、結果を検討して犯行現場由来の DNA と容疑者から採取した DNA サンプルのいずれかが適合するかどうかを確認することです。犯行現場 DNA に適合しないサンプルは捜査から除外します。犯行現場の DNA と適合するサンプルは、容疑者の一人として捜査に加えます。

クイックガイド

Lesson 1 PCR 反応の準備をする

1. PCR チューブ 5 本に CS、A、B、C、D と表示し、自分のグループ名またはイニシャルも記入しておきます。PCR チューブをそれぞれキャップのないマイクロチューブに入れ、チューブ立てに入れて氷冷します。

PCR チューブ　アダプター

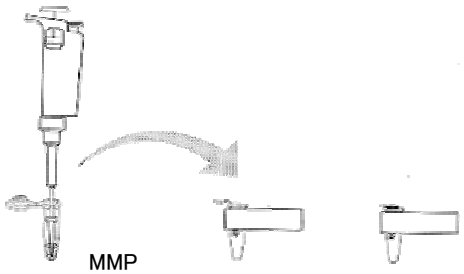
2. 下記の表を参考にして、該当する DNA テンプレート 20μl をそれぞれに表示したチューブに移します。

重要！:チップは DNA サンプルごとに新しいものと交換します。

PCR チューブの表示	DNA サンプル添加量	マスターミックス+プライマーの添加量
CS+自分のイニシャル	犯行現場由来 DNA 20μl	MMP 20μl （青色）
A+自分のイニシャル	容疑者 A の DNA 20μl	MMP 20μl （青色）
B+自分のイニシャル	容疑者 B の DNA 20μl	MMP 20μl （青色）
C+自分のイニシャル	容疑者 C の DNA 20μl	MMP 20μl （青色）
D+自分のイニシャル	容疑者 D の DNA 20μl	MMP 20μl （青色）

3. 青色の MMP（マスターミックス+プライマー）20μl を、DNA テンプレートを加えてある PCR チューブ 5 本に加えます。ピペットで吸ったり吐いたりして内容物を上下させ混合します（この操作をピペッティングといいます）。青色の MMP を加えたらチューブにはキャップをしておきます。

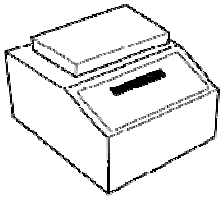
重要！:チップは毎回新しいものと交換します。
MMP を加えたらチューブには直ちにキャップをします。



MMP
（マスターミックス
＋プライマー

4. キャップをした PCR チューブはそれぞれのアダプターに入れて氷冷します。

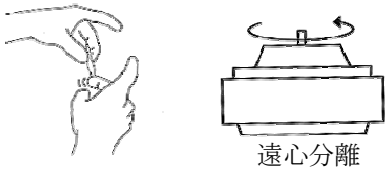
5. 先生の指示に従って、チューブをサーマルサイクラーに入れます。先生がサーマルサイクラーで PCR プログラムを設定します。



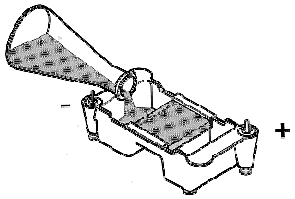
Lesson 2　PCR 産物の電気泳動

1. ゲル電気泳動装置を指示に従って準備します。

2. Lesson 1 で PCR を行ったチューブ 5 本を用意します。PCR チューブはキャップレスチューブに入れ、バランス調整した小型遠心機で数秒間スピンダウンさせ、内容物がすべてチューブの底に集まるようにします。


遠心分離

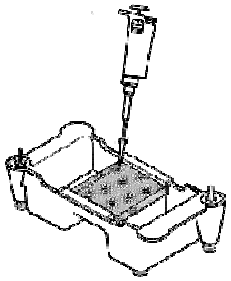
3. オレンジ G ローディングダイ 10μl を、「LD」と表示してあるチューブから自分の PCR チューブそれぞれに加えます。ピペットで液を吸ったり吐いたりして内容物を上下して混合し、小型遠心機で数秒間スピンダウンさせ、内容物をチューブの底に集めます。



4. 電気泳動装置にアガロースゲルをセットします。アガロースゲルのウェルが黒い(-)電極側、ゲルの下側が赤い(+)電極側にあることを確認します。

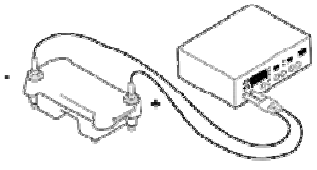
5. 電気泳動槽に、ゲルを完全に覆うのに充分な量の 1 倍濃度 TAE バッファー(約 275ml)を満たします。

6. サンプルごとに新しいピペットチップを使って、サンプル 20μl を以下の順序でゲルのウェル 6 個に加えます。



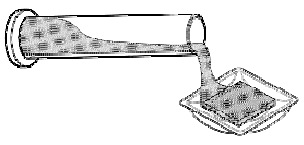
レーン	サンプル	添加量
1	アレルラダー	20μl
2	犯行現場由来	20μl
3	容疑者 A	20μl
4	容疑者 B	20μl
5	容疑者 C	20μl
6	容疑者 D	20μl

7. 泳動槽にフタをします。このフタはベース部分と合うよう、一方向だけに装着できるようになっています(赤には赤、黒には黒)。電気コードを電源装置に接続します。



8. 電源スイッチを入れ、サンプルを 100V で 30 分間電気泳動します。

9. Fast Blast DNA 染色液で染色します。



＜学生・生徒用テキスト＞

はじめに

＜Crime Scene Investigator PCR Basics キット＞

これから現実に科学捜査に利用されている DNA プロファイリングを実施します。科学捜査研究所の DNA 鑑定の検査担当者として、あなたはこれからポリメラーゼ連鎖反応（PCR）とアガロースゲル電気泳動により、ある犯行現場と 4 人の容疑者から得たDNAサンプルを分析します。犯人を特定することがあなたの任務です。この分析におけるDNAサンプル中の遺伝子型は、特別な一組の遺伝子マーカー、すなわち対立遺伝子としています。すべての人の遺伝子型は人によって異なる独自の遺伝子バーコードになっています。この実験では、何人かの人物の遺伝子バーコードを解明して、犯行現場に残されていた DNA と一致するかどうかを確認します。

＜DNA を使ってどのように犯罪を解明できるのでしょうか?＞

DNA 鑑定は、分子生物学と遺伝学を応用して DNA サンプルの正確な遺伝子型を決定し、一人の人物を他の人から識別するものです。このパワフルな手法は現在、犯行現場の鑑識や行方不明者、大災害の際の死亡者捜索、人権侵害犯罪捜査や親子関係の解明に世界中で一般的に利用されています。犯罪現場には血液や精液、毛髪、唾液、骨組織、皮膚の破片などの生体由来の証拠になり得るものが残されていることも多く、これらのものから DNA を抽出することができます。犯行現場で得られたサンプル由来の遺伝子型が容疑者の遺伝子型と適合するならば、その容疑者は犯人である可能性が高くなります。二つの遺伝子型が適合しなければ、その人物は容疑者グループからは除外されます。

＜科学捜査の簡単な歴史について＞

法医学は科学と法律学の間の境界線上にあります。科学は有罪の人に判決を下すのに充分な証拠を提供するのと同様に、冤罪を被っている人の無実の証明をする大きな証拠も提供するのです。実際に、米国では DNA 鑑定の結果、たくさんの人々が無実を証明されたそうです。科学を犯罪捜査に利用したのは、犯行現場を記録する写真が最初でした。指紋を証拠とすることは 100 年以上にわたって利用されています。鑑識作業のために最初に集められた遺伝学的な証拠は、血液型分類を利用したものでした。1980 年代になって初めて DNA を利用した法医学的検査、RFLP 法（Restriction fragment length polymorphism analysis、制限酵素断片長多型、付録 B 参照）が導入されました。RFLP 法には限界がありましたが 20 年近くにわたって法医学分析における頼みの綱となっていました。そして、先に述べた PCR の出現によって初めて、DNA を利用した鑑定方法が飛躍的に発展し、地球上の 2 人の人間を（ただし一卵性双生児は除いて）、その生死には関係なく、識別することが可能となったのです。

＜PCR とは試験管内での DNA 大量複製です＞

PCR の目的は微量の DNA から、その中の特定の部分を試験管中で大量に複製することです。技術的には、目的とする配列を含む鋳型 DNA を、決められた方法により酵素で増幅します。この鋳型は 2 本鎖の DNA であればゲノム DNA でも何でもかまいません。犯罪鑑識員は 1 滴の血液、1 つの毛包あるいは頬の細胞から微量の DNA を抽出し、PCR を使って目的の DNA 断片を数百万個も複製することができます。理論的には 1 つの鋳型があれば数百万個の DNA を合成することができるのです。PCR が開発される前は、このような微量の DNA を用いて法医学的あるいは遺伝学的研究を行うことはできませんでした。調べたい、あるいは操作したい DNA 配列を正確に増幅出来るということが、PCR の最大の強みなのです。PCR 反応には 4 つの DNA 塩基（アデニン、グアニン、チミン、シトシンのデオキシリボヌクレオチド三リン酸）、DNA ポリメラーゼ、2 つの DNA プライマー、増幅の元になる極少量の鋳型 DNA が必要になります。PCR によりほんのわずかな生物学的材料から、個人個人の遺伝子構成に関する詳しい特性を解明して、ヒト DNA の最も微妙な違いを判定することができるようになりました。PCR によってある特定の DNA 配列のまったく同じコピーが何百万と、簡単かつ迅速に作製できる技術が、近代法医学における DNA 研究の基盤となっています。

＜科学捜査ではどのような種類の DNA 配列が使われているのでしょうか?＞

ヒトのゲノムには 30 億個にもおよぶ塩基対が存在しており、人間同士ではその 99.5%以上が共通しています。しかしヒト DNA 配列にはわずかな比率（＜0.5%）で違いがあり、こうした特別な多型（「多くの形」）配列が科学捜査に用いられます。

科学捜査のプロファイリングに用いられる DNA 配列は「匿名」、すなわち、これらは人間の染色体上で既知の働きを司らない、つまり機能が不明であるような領域（遺伝子座位）に由来しているものです。遺伝子座とは基本的には遺伝子の住所または位置をいいます。単一の遺伝子座でも形態または種類が異なる場合があり、このような異なった形は対立遺伝子（アレル）と呼ばれています。1 つの座位に異なった形態が 2 つしかないこともあれば、上述のように多型である場合もあります。

科学捜査に利用される DNA 配列は非コード化領域であり、ショート・タンデム・リピート（Short Tandem Repeat、STRs）の部分を含んでいます。STRs は非常に短い配列であり、前から後へと直列の繰り返しとなっています。下の例は第 11 染色体に見られる TH01 として知られる遺伝子座を示しています。この特異的 DNA 配列には[TCAT]リピートが 4 個あります。

… C C C T C A T T C A T T C A T T C A T T CA …

世界中の人達ではTH01に20種類以上の対立遺伝子、この場合は[TCAT] の“繰返し回数の種類”（Allele、アレル、アリールと言います）が発見されています。染色体は対を成していますから、それに対応する、もう一方の染色体上にもこの遺伝子座があるわけですから、これを組み合わせると理論的には数百通りの“繰返し回数の組み合わせ”が存在し、この組み合わせが DNA 型として表現されます。

言うまでもありませんが、私たちは母親から受け継いだ一つと、父親から受け継いだ一つでその組み合わせが作られるのです。

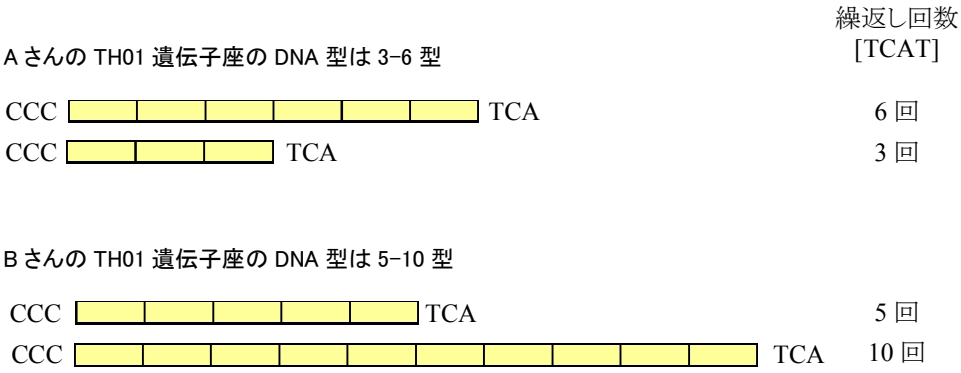


Fig.9 TH01 遺伝子座の DNA 型の例

＜STR 対立遺伝子はどのように検出するのでしょうか?＞

DNA プロファイリングで重要なことは、証拠となるわずかな量の DNA に存在しているこの遺伝子コピーをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅することです。この[TCAT]というSTR の DNA 配列に特異的なプライマーを用いることで、どのような人物であってもその DNA 配列中の 2 つの TH01 対立遺伝子それぞれのオリジナルから、何 10 億という遺伝子コピーが PCR によって合成されます。こうしてできたコピーには最初の DNA コピーに存在するのと同じ数の STRs が含まれており、アガロースゲル電気泳動法を用いて可視化することができます。既知の TH01 対立遺伝子サイズにと同じサイズを持つ DNA サイズ標準品（アレルラダー）と比較して、サンプルの DNA から得られた PCR 産物の正確なサイズを決定し比較することができます。

容疑者 A と容疑者 B の TH01 遺伝子型分析結果の模式図を Fig.10 に示します。この例では、容疑者 2 名から得られた DNA について、TH01 座位に特異的なプライマーを用いて PCR をおこないました。ゲル電気泳動で PCR 産物をそのサイズに従って分離した後、得られたバンドパターンをアレルラダーと比較して、サンプルの対立遺伝子を特定します。

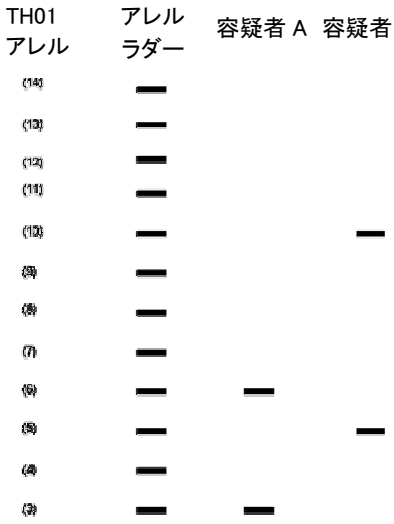


Fig.10 アガロースゲル電気泳動による分離パターン例

容疑者 A と容疑者 B が三角関係に巻き込まれ、男性をホテルで殺害したと告訴されている、というシナリオを想定してください。実際に銃の引き金を引いた人物が誰なのか、は不明です。犯行現場から得られた DNA サンプルの他に、この法医学者は、容疑者、被害者など DNA を抽出します。その後、PCR で増幅した DNA を、対照（コントロール）となる DNA とともに分析します。実際の分析には遺伝子型分析ソフトウェアを用いて 13 ヶ所の異なった座位における分析をし、識別能力を上げます。その結果を元に誰が事件に関与しているか、という証拠とします。

＜次のような筋書きを考えてみましょう＞

現場：あるホテル

ホテルの従業員が大声と女性の叫び声、そして銃声が響き渡るのを聞きます。ある従業員はすぐ窓際に走り寄り、急ぐように走り去るクルマのヘッドライトが小さくなってゆくのを見ます。また、ある従業員は開け放たれた 13 号室のドアのところにかけよると、男性が血溜りの中にうつぶせに倒れているではありませんか！従業員はすぐに 110 番に電話します。数分後、警察が到着し犯行現場の捜査を開始します。これは殺人事件なのでしょうか？

状況からみて、殺人事件のようです。そうなると、犯人は一体誰が…？

科学捜査研究所の鑑識が呼び出されて犯行現場を捜査し証拠を集めます。犯人がこれといった証拠を残して言ったように見えなくても、鑑識が 1 滴の血液や 1 本の毛髪が見つかれば、それが充分な証拠になるのです。

見つかった 生物学的証拠 はあなたの所属する科学捜査研究所に運ばれてきます。この証拠は犯人はだれなのか、犯人でなくても、そこにいたのが誰なのか、探し出す有力な手がかりを引き出すことができます。このようなサイエンスフィクションの話が現在は TV ドラマにも登場するようになりました。

現実にこのようなことが世界中で行なわれています。たった 1 個の細胞から、また時には何十年も経った古いサンプルからでも、世界中の国々の法医学研究所で鑑定はいつでもおこなわれています。これが可能なのはその血液や髪の毛に DNA であるからなのです。

日本で DNA 鑑定を実施しているのは科学捜査研究所の鑑識や大学の法医学研究室の研究者などであり、そこにいる法医学の専門家達は完全な DNA を抽出できる生物試料を必要とします。犯行現場に残された試料はきわめて少量しかないので、その量では分析ができないようなことも多くあります。この問題を克服するために法医学の専門家達は、PCR という、細胞分裂の際に起こる DNA 複製のメカニズムを利用した手法を用いて、充分量の DNA を得るのです。

この授業では、シミュレーション用の犯行現場と犠牲者から得られた DNA テンプレートを用いて、TH01 遺伝子座という単一座位における PCR 分析を行います。PCR に引き続いて、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を分離して PCR 産物を可視化し、この座位に想定される対立遺伝子をシミュレーションしたスタンダード（アレルラダー）と比較し、各サンプルの遺伝子型を決めます。次に容疑者の遺伝子型が犯行現場のものと適合するかどうかを調べて、犯人は誰なのか突き止め、事件を解決しましょう。

＜質問 －　はじめに＞

1. 犯行現場から得られたどのような証拠品に DNA が含まれている可能性がありますか？
   そして犯行現場のどのようなところにそういった証拠を見つけることができると思いますか？

2. 犯行現場から得られた DNA で、なぜ PCR を行う必要があるのでしょうか？

3. 証拠から抽出された DNA を、PCR を行わずにゲル電気泳動をするとその結果はどうなりますか？

4. 遺伝子型とは何ですか?

5. 対立遺伝子と遺伝子座の違いは何ですか?

6. 科学捜査ではなぜ遺伝子ではなく非コード化 DNA を分析するのでしょうか?

Lesson 1 PCR による増幅

PCRとは試験管内でのDNA複製です。複製したいDNAの部分は標的配列と呼ばれます。犯行現場で得られたDNAサンプルと容疑者のDNAサンプルにはこの標的配列が含まれています。

＜PCR は DNA の三大特性を利用しています。＞

変性 : 2 本鎖の DNA テンプレート(鋳型)を 1 本鎖ずつに分ける

アニーリング : DNA プラーマーが相補的 DNA 鎖にハイブリダイゼーション(結合)

伸長 : DNA ポリメラーゼが DNA 鎖を合成

1. 変性

DNA の合成を開始するには、DNA テンプレートの 2 本鎖をほぐして 1 本鎖に分離しなくてはなりません。細胞内ではこれは酵素によっておこなわれています。PCR では熱を利用して、2 本鎖 DNA テンプレートを 1 本差に分離(**変性**) させます。

2. アニーリング

DNA の標的領域を増幅するには、まず目的とする標的配列の上流側(5'末端)および下流側(3'末端)の短い DNA 配列を選びます。次にこの選択した領域に相補的な配列を持つ**プライマー**、すなわちオリゴヌクレオチドと呼ばれる短い DNA 片を作製します。(Fig.11)。プライマーは増幅すべき DNA 標的配列の増幅開始点と終了点として働きます。

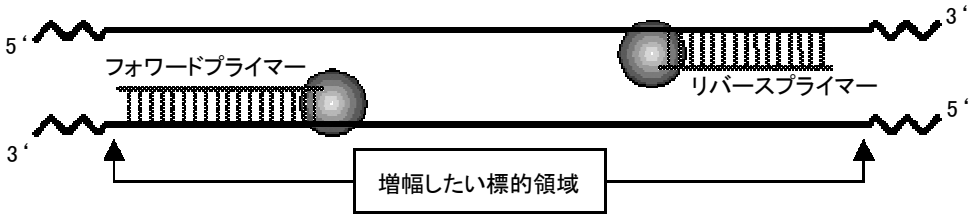


Fig.11 プライマーが標的 DNA 配列にアニーリング

PCR では、プライマーがテンプレートの相補的塩基配列にアニーリング、すなわち結合すると、相補的な鎖間でハイブリダイゼーションが起こります。ハイブリダイゼーションとは、プライマーが DNA テンプレートに結合する事をいいます。2 種類のプライマーは特異的なヌクレオチド配列が用いられ、任意に設計され、合成されます。相補的な鎖の末端にアニーリングして、増幅すべき 2 本鎖 DNA(テンプレート)の標的部分を挟みます。つまり、標的配列はプライマーがアニーリングする位置によって選択されるのです。

3. 伸長

DNA **ポリメラーゼ**が、**ヌクレオチド**に結合して DNA を付加しながら伸長するには、既存のヌクレオチド鎖を必要とするため、プライマーが必要となります。ポリメラーゼがテンプレートとなる DNA とプライマーを見つけて結合すると、ヌクレオチドの付加が開始されます。ヌクレオチドを次々とプライマーに付加し伸長してゆくことで、テンプレーDNA の新しいコピーを合成します。従ってプライマーは DNA ポリメラーゼのための開始点となるのです。

以上の 3 段階、すなわち変性、アニーリングおよび伸長が一緒になって 1 つの PCR サイクルを構成しています。PCR 反応を完全にするには 1 回の PCR サイクルを数多く繰り返します。この実験でおこなう PCR 反応のサイクル数は 35 回となります。

PCR サイクルは 52℃から 94℃という温度範囲で反応を繰り返すため、PCR に用いる酵素(DNA ポリメラーゼ)は熱に対して安定でなくてはなりません。熱安定性 DNA ポリメラーゼは、好熱バクテリアの *Thermus aquaticus*(Taq)から単離されて

います。このバクテリアイエローストーン国立公園にある高温蒸気排出口のような高温環境に棲息しています。

テンプレートとなる 2 本の鎖は 1 回目の反応サイクル（変性、アニーリングおよび伸長） の後に 1 本鎖にされたオリジナルのテンプレートから作製されます。各サイクルが完了するたびに、テンプレート分子の数は対数的に増加する、つまりDNA コピー数はサイクルごとに倍増するため、この反応はポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase chain reaction、PCR)と呼ばれています。従って 35 サイクルの後にはコピー数は開始時の 2^{35} 倍となります。35 サイクルのあとには、対象とする DNA はゲル電気泳動および染色によって可視化するのに充分な量が増幅されています。このように PCR よって、サンプル中に目的の遺伝子が含まれているかいたかどうかを判断することができるのです。

PCR を効率的に行うためには、いくつかの要素が必要です。DNA テンプレート、オリゴヌクレオチドプライマー、そして酵素（*Taq* DNA ポリメラーゼ）の他にも、マスターミックスと呼ばれる特殊な反応バッファーも必要です。マスターミックスには PCR が起こるためのすべての要素、例えば DNA を構成するブロック片となる物質（ヌクレオチド、すなわち dNTPs）、至適 pH を維持するための特殊なバッファー、塩、および $MgCl_2$ などが含まれています。塩とマグネシウムイオン（コファクター）は Taq DNA ポリメラーゼの働きを最大に高めるために必要です。この実験では、先生がこれら上述の内容成分をすべて加えた上に、色付きのプライマーと Taq ポリメラーゼも加えた調製済みのマスターミックスを皆さんに配ります。マスターミックスは使用前には氷冷しておき、DNA テンプレートを加える前に酵素反応が開始しないようにすることが重要です。

この実験では、仮想上の犯行現場および犯行に関連性があると疑われる 4 名の人物から採取された DNA サンプルが配布されます。皆さんにはこれら DNA サンプルのある領域（TH01 座、多型対立遺伝子）を PCR により増幅していただきます。PCR が完了したら次に、自分の PCR 産物をゲル電気泳動により分析して、TH01 座位におけるサンプルの遺伝子型を決定し、犯行現場から得られた DNA がどの容疑者の DNA と同じになるかを検証します。

＜質問　－Lesson 1＞ … PCR に関する質問

1. PCR では DNA を用いてどのようなことができますか?

2. PCR をおこなうにはどのような材料が必要ですか?

3. マスターミックスとは何ですか? また各成分はなぜ必要なのでしょうか?

4. 犯行現場から得られた証拠である DNA で PCR を行う必要があるのはなぜですか?

5. PCR のサイクルはどのような段階で構成されていますか? また各段階ではどのようなことが起こるのでしょうか?

Lesson 1 実験手順

＜使用する試薬・機器の一覧＞

生徒用実験台	数量
DNA のチューブ 6 本が入っているアイスボックス	1
マスターミックス+プライマー（MMP、青い液体）	1
犯行現場由来、容疑者 A～D の DNA	各 1、計 5
PCR チューブ	5
PCR アダプター	5
チューブ立て	1
油性マーカーペン	1
P－20 マイクロピペット	1
P－20 用ピペットチップ	1

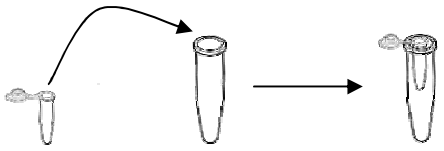
1. 実験台の上には白いフロートに入れて氷冷してあるチューブ 6 本と、0.2ml の PCR チューブ 5 本入りのラックがあります。アイスボックスには以下のものが入っています。

・青い液体が入った MMP と表示してある黄色いチューブ 1 本

・CS（紫色のチューブ）、A（緑色のチューブ）、B（青色のチューブ）、C（オレンジ色のチューブ）および D（ピンク色のチューブ）と表示してあるチューブ計 5 本

PCR チューブに CS、A、B、C、D と表示し、自分のグループ名またはイニシャルも記入してください。表示は次の表の内容に合わせます。

PCR チューブの表示	DNA テンプレート（原液のマイクロチューブ）	マスターミックス+プライマー（青い液体）
CS+自分のイニシャル	犯行現場由来の DNA 20μl（紫色チューブ）	MMP 20μl （黄色いチューブ）
A+自分のイニシャル	容疑者 A の DNA 20μl（緑色チューブ）	MMP 20μl （黄色いチューブ）
B+自分のイニシャル	容疑者 B の DNA 20μl（青色チューブ）	MMP 20μl （黄色いチューブ）
C+自分のイニシャル	容疑者 C の DNA 20μl（オレンジ色のチューブ）	MMP 20μl （黄色いチューブ）
D+自分のイニシャル	容疑者 D の DNA 20μl（ピンク色のチューブ）	MMP 20μl （黄色いチューブ）



PCR チューブ　　アダプター

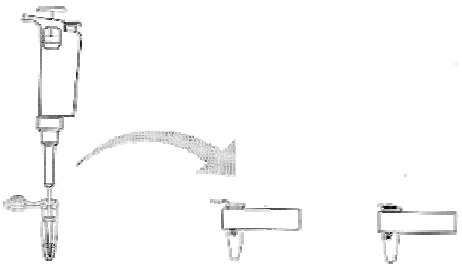
2. この手順の間はチューブを氷冷しておいてください。

3. 20µl に設定した P－20 マイクロピペットにピペットチップを付け、DNA を上述の表の通りに各チューブに加えます。例えば、犯行現場の DNA については、テンプレート 20μl を「CS」と表示した PCR チューブに移します。

重要！: **DNA ごとにピペットチップは新しいものと交換して使ってください。**

4. 20µl に設定した P－20 マイクロピペットにピペットチップを付け、MMP（マスターミックス + プライマー混合物）20µl を上述の表の通りに各チューブに加えます。緩やかにピペットで内容物を吸ったりはいたりして上下させ、 PCR チューブの内容物がよく混ざるようにします。

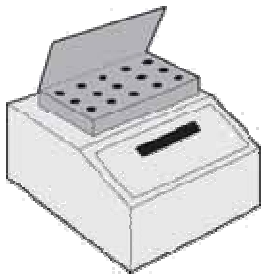
重要！: **DNA ごとにピペットチップは新しいものと交換して使ってください。**MMP をチューブに加えたら、キャップをします。この状態で PCR チューブ内の溶液は青色となっているはずです。青色になっていない場合は先生に相談してください。



MMP
（マスターミックス
＋プライマー

5. キャップをした PCR チューブをそれぞれのアダプターに入れて氷冷します。DNA テンプレートを入れたチューブが邪魔であればアイスボックスの外に出して PCR チューブを氷冷します。

6. 先生の指示に従って、チューブをサーマルサイクラーに入れます。



Lesson 2 PCR 産物の電気泳動

PCR が完了しました。しかしこの時点ではまだ PCR 産物が本当にできているかは実際にはわかりません。ゲル電気泳動で PCR 産物を分離し、DNA 染色により可視化して確認することができます。DNA はマイナスに荷電しているため、電流を利用して分離が可能です。実際、電気泳動とは「電流により運搬する」という意味です。DNA を固めたアガロースで電気泳動します。アガロースは濃度によってサイズが異なる、小さい孔があいている“ふるい”となります。アガロース濃度が高いほど孔の大きさは小さくなり、大きい分子ほど通過に時間がかかります。このことは同じサンプル中にサイズの異なる DNA 分子が含まれている場合の比較には特に有用です。ゲルに電流が通じると、ゲル中を DNA が移動していきます。ゲルはバッファー中に浸してあるため、電流はバッファーとゲルを通って流れ、マイナス荷電している DNA をプラス荷電の陽極側に移動させるのです。

TH01 座位における想定されるすべての対立遺伝子を示す DNA アレルラダーと PCR 産物を一緒に電気泳動します。アレルラダーは自分がおこなった PCR 産物と比較する際の基準、すなわちマーカーとなるもので、これによって相対的なサイズやその正体を判定することができます。下に示したゲルの図では、最初の列はアレルラダーレーンです。これらのバンドはこの遺伝子座にあることがわかっている全対立遺伝子の標準的なサイズを示しています。想定される対立遺伝子、繰返し回数は 8 個あり、うち最大サイズのものがゲルの上に、最小サイズのものがゲルの下に現れます。各サイズは上から下に、1500、1000、700、500、400、300、200 および 100 塩基対(bp)となっています。対立遺伝子名は図中に示してあります。次に続くレーンは容疑者 DNA サンプルから得られた PCR 産物です。

Fig.12 に示すように、アレルラダーの次のレーンである犯行現場サンプル(CS)には、アレルラダーの 5 番と 2 番に相当する遺伝子型があります。この場合、このサンプルの遺伝子型は 5-2 型であるとします。次のサンプルでは、遺伝子型は 7-4 型と続きます。

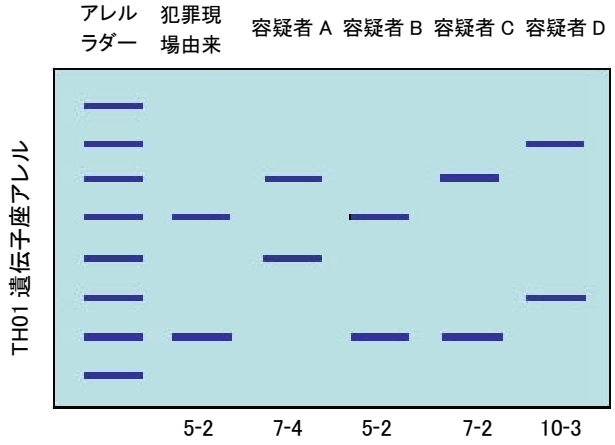


Fig.12 Crime Scene Investigator PCR Basic キットを用いた TH01 座位における結果例

＜質問 － Lesson 2＞

1. DNA はなぜアガロースゲル内を移動するのでしょうか?

2. この実験で DNA プロファイルを作製するのに用いられている 2 つの実験手法は何ですか? またそれぞれが果たす機能はどのようなものですか?

3. アレルラダーとは何ですか? DNA プロファイリングではどのような役割を果たしますか?

4. 電気泳動の後で DNA を可視化するには何が必要ですか?

Lesson 2 実験手順

＜使用する試薬・機器の一覧＞

生徒用実験台	数量
3%アガロースゲル	1 枚
Lesson 1 で得た PCR 産物	計 5
犯行現場由来 DNA	1
容疑者 A の DNA	1
容疑者 B の DNA	1
容疑者 C の DNA	1
容疑者 D の DNA	1
1 倍濃度の TAE 電気泳動用バッファー	300～350 ml
*オレンジ G ローディングダイ（オレンジ色の液体）	60μl
*アレルラダー（オレンジ色の液体）	25μl
P－20 マイクロピペット	1
P－20 用ピペットチップ	1
ゲル電気泳動槽	1
（実験台 2 台で 1 台の泳動槽を共有することも可能です）	
電源装置（多数の実験台で共有できます）	1
Fast Blast DNA 染色液	1
ゲル染色用トレー	1

注！:この 2 つのオレンジ色の液体を間違えないように。含まれている内容物が異なります。

＜実験手順＞

1. 指示に従ってゲル電気泳動装置を組立てます。

2. Lesson 1 で得た PCR 産物 5 本を、キャップレスのチューブアダプターに入れ、チューブをチューブ立てまたはラックに入れます。

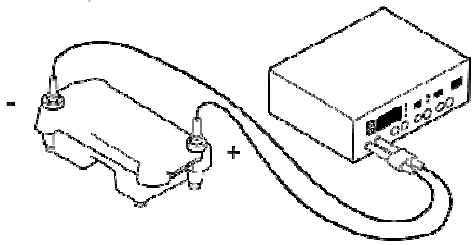
3. 10μl に設定したマイクロピペットにピペットチップを付けて、オレンジ G ローディングダイ（「LD」と表示したチューブ）を各 PCR 産物が入ったチューブに加えて充分に混合します。

重要！:ピペットチップはサンプルごとに交換してください。

4. 下記の表を参考にして、アレルラダー20μl および各サンプル 20μl を表示の通りの順序でゲルに加えます。

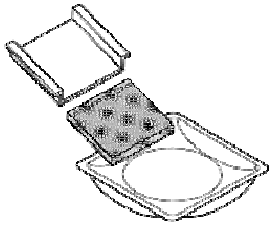
レーン	サンプル	容量
1	アレルラダー	20μl
2	犯行現場由来	20μl
3	容疑者 A	20μl
4	容疑者 B	20μl
5	容疑者 C	20μl
6	容疑者 D	20μl

5. 電気泳動槽に蓋をします。電気コードをパワーサプライにつなぎます。陽極は陽極に（赤は赤に）、陰極は陰極に（黒は黒に）つなぎます。

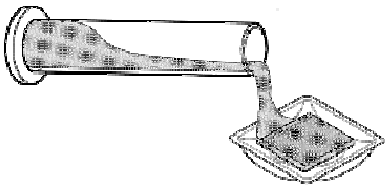


6. 100V で約 30 分間電気泳動してください。通電して間もなく、色素がゲル内を陽極に向かって移動するのが見えます。泳動初期と終了時の電流値を確認し、その値を控えておきます。

7. 電気泳動が終わった後、パワーサプライの電源を切ってから、蓋を泳動槽から外してください。注意深くゲルトレーとゲルをゲル箱から出して下さい。ゲルは滑べりやすいので注意しましょう。両手の親指でゲルを押し出し、注意深くプラスチックの染色トレーにスライドさせてください。



8. 約 60ml の Fast Blast DNA 染色液をトレーに入れてください。染色トレイを食品保存用ラップで覆います。オーバーナイトステインの場合、1 晩染色します。クイックステインの場合は 2～3 分置いて染色します。



Lesson 3 ゲルの乾燥と DNA パターンの分析

ゲルをセロハンシートにはさんで乾燥し、実験ノートに貼り付けると結果を長く保存することができます。ウェットゲルを分析するには、ゲルをスキャンし、フォトコピーを作成する(背景を黄色にすればコントラストが強くなります)か、 またはアセテートフィルム上にトレースします。ゲルを乾燥するには 2 つの方法があります。3%アガロースゲルの場合、ゲルサポートフィルムでもきれいに乾燥できないことがありますので、ご注意ください。

＜実験記録を長期保存するためのアガロースゲル乾燥(操作時間約 10 分)＞

注意:アガロースゲルを乾燥させるためには、バイオ・ラッド製高強度分析用アガロースを使用する必要があります。脱色したゲルを乾燥させる方法は 2 通りあります。

方法 1

バイオ・ラッド製のゲルサポートフィルム(170-2984)を使用します。脱色したアガロースゲルを染色トレーから取り出します。ゲルサポートフィルムにゲルを直接載せます。ゲルをフィルム中央に置き、完全に乾燥するまで空気乾燥します。ゲルは乾燥するとフィルムに結合し、縮みません。サポートフィルム上に室温で静置しておけば、2～3 日後には完全に乾燥します。その結果、平坦かつ透明で耐久性のある実験記録ができるでしょう。

方法 2

ゲルを染色、脱色した後、プラスチック染色トレー上にゲルを放置し、2～3 日空気乾燥させます。ゲルは乾燥するとかなり縮みますが、比率は変わりません。静かに染色トレー上に放置すれば、ゲルは比較的平坦なままですが、乾燥するにつれてシワができるでしょう。

＜結果の分析＞

乾燥したゲルを分析することも可能ですが、高濃度アガロースゲルは平らに乾燥することが困難な場合もあるのでご注意ください。さらに染色後のゲルを光に当てると染色が薄れる場合もありますので遺伝子型の分析と決定はウェットゲルで行う方が適しています。

ゲルを Fast Blast DNA 染色液で染色したら、その時点で各サンプル中にある対立遺伝子を判定して DNA プロファイル(遺伝子型)を判定します。各レーンに見えるバンドサイズを 1 番レーンで電気泳動したアレルラダーと比較します。代表的な泳動結果、ラダーのバンドのサイズ、およびラダーの対立遺伝子の表示方法については Fig.10(29 ページ)または Fig.12(37 ページ)をご覧ください。PCR 産物のバンドごとに、アレルラダーから相当するサイズのバンドに従って対立遺伝子を決定していきます。アレルラダーのバンドは上から下へ、最も大きい対立遺伝子を 15 番として順に番号が付いています。各バンドのサイズは下の表に示してあります。Fig.12 に示した例では、右から2番目のサンプルの対立遺伝子型は 5-2 型です。このレーンでは繰返し回数が 5 回と 2 回のサイズのバンドがあるからです。下の表に自分の班の遺伝子型を記入しましょう。

レーン	サンプル	バンドの数	どの対立遺伝子があるか?
1	TH01 アレルラダー		
2	犯行現場由来の DNA		
3	容疑者 A の DNA		
4	容疑者 B の DNA		
5	容疑者 C の DNA		
6	容疑者 D の DNA		

＜質問 － Lesson 3＞

1. どのサンプルからも PCR 産物ができましたか? もしできなかった場合にはその理由を考え、説明してみましょう。

2. 自分の各サンプルの遺伝子型は何ですか?

3. 犯行現場由来 DNA サンプルの遺伝子型はいずれかの容疑者の遺伝子型と一致しますか? 一致する場合、どの容疑者と一致していますか?

4. この結果から、どの容疑者を捜査に加え、また除外するべきですか？その根拠も説明してみましょう。

5. TH01 遺伝子座における対立遺伝子は 8 個あり、どれも同じ確率で出現するとします。集団内においていずれか 1 つの対立遺伝子が出現する確立はどれくらいでしょうか?

6. メンデルの独立の法則と上記問題 5 の想定をもとにすると、犯行現場で採取したサンプルの遺伝子型頻度はどの程度でしょうか？

7. 容疑者が 13 名おり、うち 1 名のみが犯行現場で検出された TH01 座に適合する遺伝子型があることがわかったと仮定します。TH01 座位について算出された遺伝子型のみを元にして犯人を特定することは適当であると思いますか? その根拠を説明してみましょう。

付録 A　DNA と PCR について

＜DNA とは？＞

DNA（Deoxyribo nucleic acid、デオキシリボ核酸）は塩基と呼ばれる 4 つの異なる分子が連なる長いポリマー分子です。この 4 つの塩基はヌクレオチドともよばれます。これら 4 つの塩基すなわちヌクレオチドの組み合わせが特有の DNA 配列（遺伝子型、遺伝子、対立遺伝子など）を作り上げるのです。ヌクレオチドは 3 つの異なる分子からなります。

- **窒素塩基**
- **リボース（糖の 1 種）**
- **リン酸基**

各々のヌクレオチドは同じリボース糖とリン酸グループを持っています。各々のヌクレオチドの違いは窒素塩基によって各ヌクレオチドの違いが生じます。全部で 4 つの窒素塩基が存在します。

- **アデニン（A）**
- **チミン（T）**
- **グアニン（G）**
- **シトシン（C）**

長い DNA ヌクレオチド鎖、或いは配列は次のヌクレオチドのリボースにリン酸基が結合することで形成されます。長いヌクレオチド鎖はリン酸とリボースの結合により作られます。この結合の鎖が DNA 分子の骨格になるのです。この 1 本鎖の異なる末端に名前をつけるためには、生化学で良く使う言葉を利用する必要があります。糖の炭素には普通名前がついています。ヌクレオチドのリボースは 5 つの炭素を含んでいます。あるヌクレオチドのリン酸基（PO_4）はこのリボースの 5 位の炭素と結合しています。このリン酸基は次のヌクレオチドのリボースの 3 位の炭素に結合しています。

ですから、（別のヌクレオチドのリボースにくっついていない）フリーのリン酸基がある方の、1 本鎖 DNA 分子の末端は 5'末端、リボースの第 3 位の炭素についたフリー（次のヌクレオチドのリン酸がついていない）の水酸基（OH）をもった 1 本鎖 DNA の末端は 3'末端と呼ばれます（Fig.13 参照）。

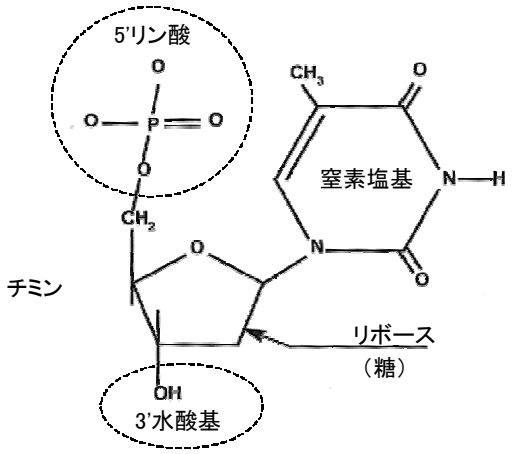


Fig.13　デオキシリボ核酸の構造

1 本鎖 DNA は 5'末端を左に、3'末端を右にして見るのが普通です。ですから、1 本鎖 DNA 配列は左から右へ、 5'末端から始まって 3'末端で終るのです。ほとんどの DNA 配列は左から右に読みます。

しかし、染色体を構成する長い DNA 分子は 1 本鎖ではありません。DNA は実際には 2 本鎖の分子であり、2 つの 1 本鎖 DNA が窒素塩基間の水素結合によって結び付けられたものである、とワトソンとクリックは（メセルソンとスタールの力を借りて）DNA の X 線結晶パターンや、少々想像の入った分子モデルから推測しました。この 2 本鎖分子はしばしば 2 本鎖と呼ばれます。2 本鎖 DNA 分子にはいくつかの重要な性質があります。

・ 染色体（ゲノム）DNA は 2 本鎖である。
・ 全体の構造は螺旋状で、2 つの鎖がねじれている。
・ リボース-リン酸の骨格が梯子の側面に相当する。
・ 水素結合で結ばれた窒素塩基（A、T、G、C）は梯子の横木のようなものである。
・ 水素結合は A-T、G-C 間でしか形成されない。 A が T に、あるいは G が C に結合したとき、それは「塩基対」と呼ばれる。C-T、A-G 間では水素結合は形成されない。
・ 2 つの DNA 鎖の方向は、逆方向である。すなわち DNA 鎖の構造は反対向きである。それは、一方の DNA 鎖について、梯子は 5'→3'（左から右へみた時）へ向かうのに対して、もう一方の DNA 鎖については、3'→5'（左から右へみた時）へ向かう。

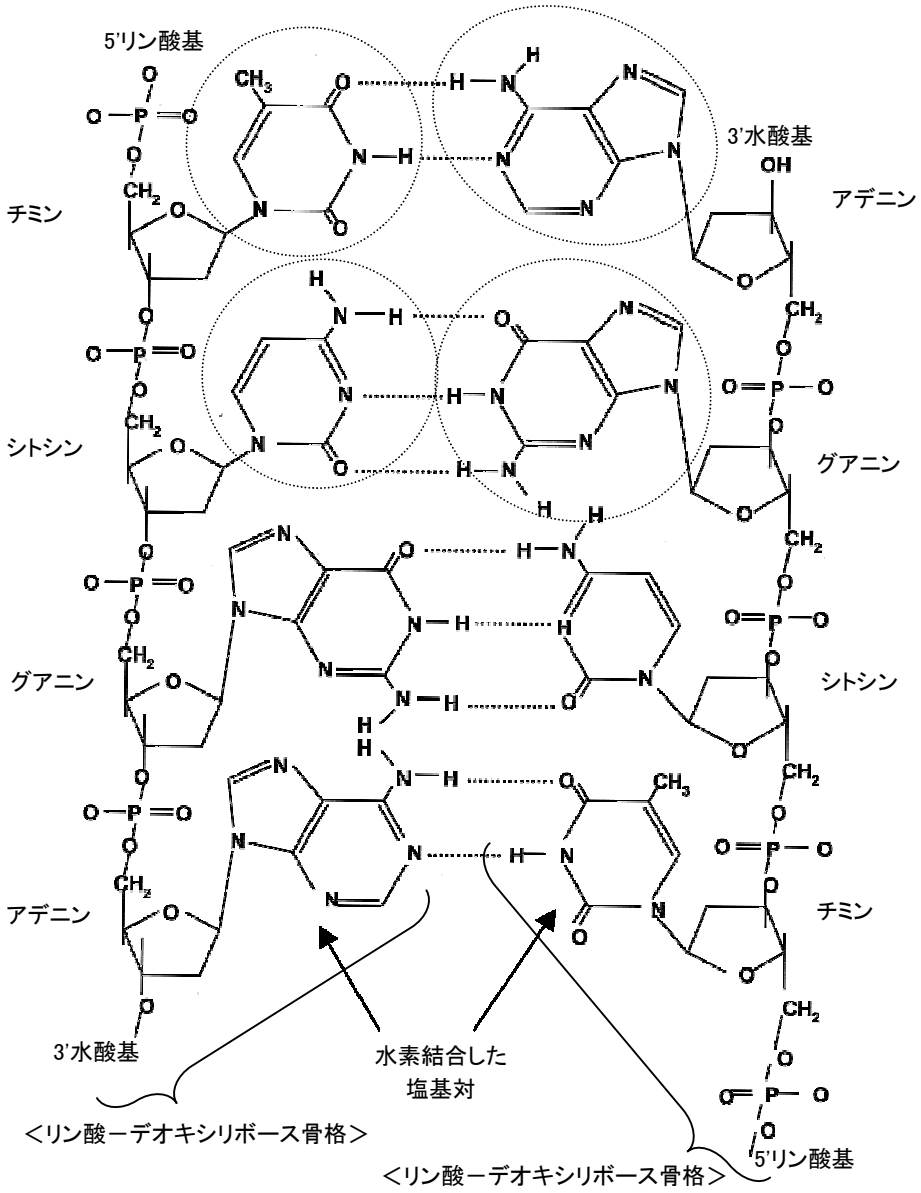


Fig.14 DNA 骨格の分子構造

この構造から言えることは、

- A は T のみ、G は C のみに結合するので、この 2 つの DNA 鎖は完全に反対の、**相補的な配列**をもち、方向は反対になる（1 つは 5'から 3'へ、もう 1 つは 3'から 5'になる）。
- 1 つの鎖は順方向（センス）鎖、もう 1 つは逆方向（アンチセンス）鎖とよばれる。
- これら 2 つの相補的な DNA 鎖は塩基間の水素結合を介してお互い結合（アニール）する。
- 新しい DNA 鎖を合成するときは、相補的な DNA 鎖を鋳型にする。
- それゆえ両方の DNA 鎖が同じ情報を持ち、それを伝えることができる。

全ての 2 本鎖 DNA 分子の長さは塩基対（bp）で現します。もし DNA 鎖が 1,000bp 以上の長さなら、キロ bp（kb）という単位を使います。もしそれが 100 万以上なら、単位はメガ（10^6）bp（mb）になります。

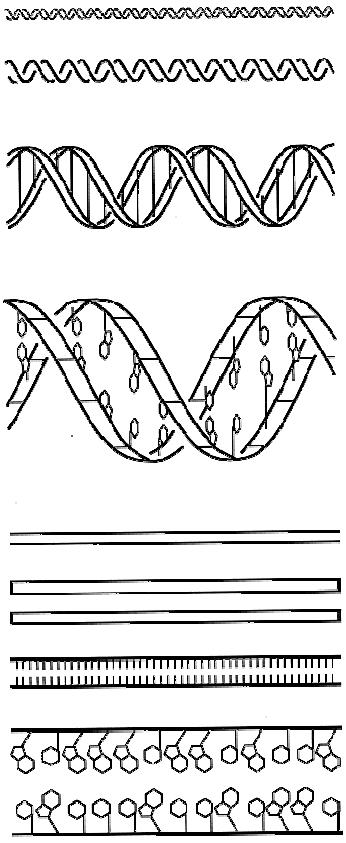


Fig.15 DNA（デオキシリボ核酸）－遺伝情報を保存する長い鎖状の分子。DNA は色々な方法で図案化されています。

＜DNA 複製－DNA 鎖の合成＞

新しい DNA 鎖は DNA ポリメラーゼと呼ばれる酵素によって合成されます。新しい DNA 鎖は常に 5'→3'方向です。新しい 1 本鎖 DNA を合成する為には、もう 1 つの 1 本鎖が必要です。相補鎖を作るのに必要な DNA の 1 本鎖は鋳型と呼ばれます。

しかし、DNA ポリメラーゼが新しい相補鎖を合成するには、ポリメラーゼが合成を開始するための短い 2 本鎖 DNA が必要です。DNA ポリメラーゼの開始部位を作るために、鋳型鎖にアニールする短い DNA 鎖（20～50bp）はオリゴヌクレオチドプライマーと呼ばれます。このプライマーは、殆どの場合、複製開始地点周辺の鋳型の一部分に相補的な短いオリゴヌクレオチド鎖です。それには、DNA ポリメラーゼが次のヌクレオチドの 5'リン酸をくっつける事の出来る、フリーな 3'水酸基（-OH）が必ず必要です。

この DNA ポリメラーゼは周囲から遊離しているヌクレオチド（A,G,C,T のいずれか）を拾い、それの 5'リン酸を新しい相補鎖の 3'水酸基（OH）に結合させます。この 5'から 3'への結合過程によって新しい DNA 鎖の骨格が形成されていきます。

DNA ポリメラーゼは、新しい鋳型鎖とヌクレオチドが相補的であるときにのみ 2 つのヌクレオチドを結合させるので、この

新しく合成されたDNA鎖は鋳型との相補性を維持しています。例えば、新しく合成するDNA鎖の3'末端にG（グアニン）がつくのは、それと水素結合を形成できるC（シトシン）が鋳型鎖にある時のみです。鋳型鎖のヌクレオチドがA（アデニン）、T（チミン）、グアニンであるときには、グアニンが新しいDNA鎖に結合することはありません。

DNAポリメラーゼによるDNA鎖合成によって、DNAは体細胞分裂中に複製されます。両方のDNA鎖は同時に合成されます。

おわかりのように、DNA、RNA そしてタンパク質は相互に作用しています。ですから、色々な生命現象の発生機構を理解しようとしている今日の科学者達が、遺伝暗号中の情報の流れについて完全に理解するためには、タンパク質だけでなく核酸も研究しなければならない、という事がおわかり頂けるでしょう。ここ 20 年の間に核酸を扱う技術が進歩したおかげで、科学者達はついに生命現象における核酸の役割を研究する方法を手に入れたのです。

多くの科学者達による研究の1つ1つが、遺伝暗号の解明という最も不思議な生命のパズルの1つを解き明かす原動力となったのです。1985 年、ある大発明を起こすに充分なパズルのピースが集まりました。細胞の中で正確に DNA を複製するために必要な分子機構が解き明かされたことが、試験管の中で DNA を作る技術の発展に繋がりました。この技術が**ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）**といわれます。

＜PCRとは？＞

PCRは遺伝学の最も基本となる2つの原理を利用しています。

1. DNA鎖は相補的に結合（ハイブリダイズ）する。
2. DNA鎖はDNAポリメラーゼによって合成される。

PCRにおける、相補的なDNA鎖の結合とは、2つの異なるプライマーが、各々鋳型上に存在する相補的な塩基配列に結合（アニーリング）することです。この2つのプライマー（オリゴヌクレオチドプライマー）は、増幅する2本鎖DNA（鋳型）の各々のDNA鎖の3 末端に特異的に付着するようなヌクレオチド配列を含むように人工的に合成します。

プライマーが必要なのは、DNAポリメラーゼが鋳型 DNA の複製を開始して新たに合成するためには、1 本鎖ではなく2本鎖のDNAがなければならないからです。鋳型であるDNAの2本鎖は合成の前に熱変性させて1本鎖にします。そのため、DNAポリメラーゼの開始地点として2本鎖の部位を用意するにはプライマーがどうしても必要なのです。DNAのある領域を増幅する前に、その領域の末端の塩基配列を同定しておく必要があります。そうしてその配列は DNA 複製の開始点として働くオリゴヌクレオチドプライマーを作るために用いられるのです。

しかし、PCRで用いるDNAポリメラーゼは絶対に耐熱性のポリメラーゼでなくてはなりません。これはPCRの反応サイクルが60℃前後と94℃の間で起こるからです。この合成反応を行う熱耐性 DNA ポリメラーゼ（Taq）は、*Thermus aquaticus* というイエローストーン国立公園[6]などでみられる高熱の温泉に住む好熱性細菌から分離されたものです。

1つの鋳型からは、1回の合成サイクル毎に2つの鋳型DNAが合成されます。そのため、鋳型分子の数は指数関数的に増幅、すなわち一回のサイクル毎に数が倍になるわけです。ですから、35 サイクルの後には、反応開始時点の 2^{35} 倍の反応産物が得られるはずです。1度目的のDNAが十分増幅されれば、それをゲル上で電気泳動することで可視化できます。これにより、科学者は目的の PCR 産物の有無や各個人の遺伝子の異同を調べることができるのです。遺伝子によっては、個人差が数百 bp であることもありますし、1bp あるいは1塩基変異のような小さな違いにすぎないこともあります。

＜PCRの手順＞

PCR 技術では、**①鋳型の変性、②プライマーのアニーリング（結合）、③TaqDNA ポリメラーゼによる伸長**という一連のサイクルが繰り返されます。

鋳型 DNA、オリゴヌクレオチドプライマー、耐熱性 DNA ポリメラーゼ（Taq）、4 つのデオキシヌクレオチド（A、T、G、C）を含む反応液をまとめて 1 つのマイクロチューブで混ぜます。このマイクロチューブをサーマルサイクラーに入れます。サーマルサイクラーにはサンプルを保持し、温度を大きく急激に上下できるアルミ性のブロックがあります。このアルミブロックでサンプルを急速に加熱したり冷却したりする事を「温度サイクル」あるいは「熱サイクル」といいます。

温度サイクルの最初の段階はサンプルを 94℃にまで温めることです。このような高熱下では、鋳型 DNA 鎖は1本鎖に分離します（変性）。そのため、これを「**変性（denature、ディネイチャー）**」とよびます。

このサーマルサイクラーは温度を 52℃にまで急速に下げ、分離した鋳型鎖にプライマーがアニーリング（結合）出来るようにします。これは「**アニーリング（annealing）**」と呼びます。もともとの 2 本の鋳型鎖が、再び結合したりプライマーと競合したりする可能性はあります。しかし、オリゴヌクレオチドプライマー量の方がずっと多いので、プライマーが鋳型 DNA 鎖の相補的配列にくっつく可能性のほうがずっと高いのです。

最後に、サンプルを 72℃に加熱し、TaqDNA ポリメラーゼがプライマーにヌクレオチドを付加して伸長し、各々の鋳型 DNA 鎖から完全な複製産物をつくれるようにします。これは「**伸長（extension、エクステンション）**」とよばれます。Taq ポリメラーゼはこの温度で最も効率良くはたらきます。そうして、2 つの相補的な DNA 鎖が合成されます。すなわち、鋳型 DNA が 2 つになったわけです。この 2 つの鋳型 DNA は次の温度サイクルや DNA 鎖の合成に利用されます。

ここで、1 つの完全な温度サイクル（熱サイクル）が完了するのです（Fig.16 参照）。

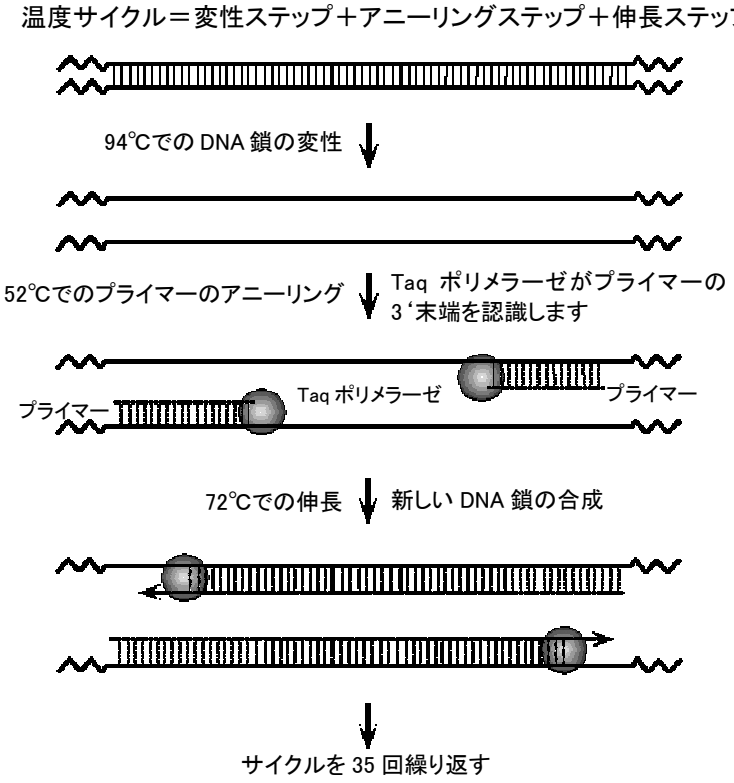


Fig.16 PCR の全サイクル

温度サイクルは 35 回繰り返されます。各温度サイクルの度に、鋳型鎖の数は 2 倍になり、鋳型 DNA の数は指数関数的に増加します。35 サイクルの後、鋳型 DNA の数は理論的には 3.4×10^{10} 倍になっている筈です。

PCR で最も特徴的なのは、正確な長さと塩基配列をもった DNA が合成されることです。始めのサイクルでは、2 つの異なるオリゴヌクレオチドプライマーが別々の鎖の両端に付着します。最初の温度サイクルが完了した後、2 つの新しい DNA 鎖が合成されるわけですが、それはもとの鋳型 DNA よりは短く、しかし増幅する DNA よりは長くなります。正確な長さの DNA が合成されるのは、3 回目の温度サイクルが終った後です。（Fig.17）

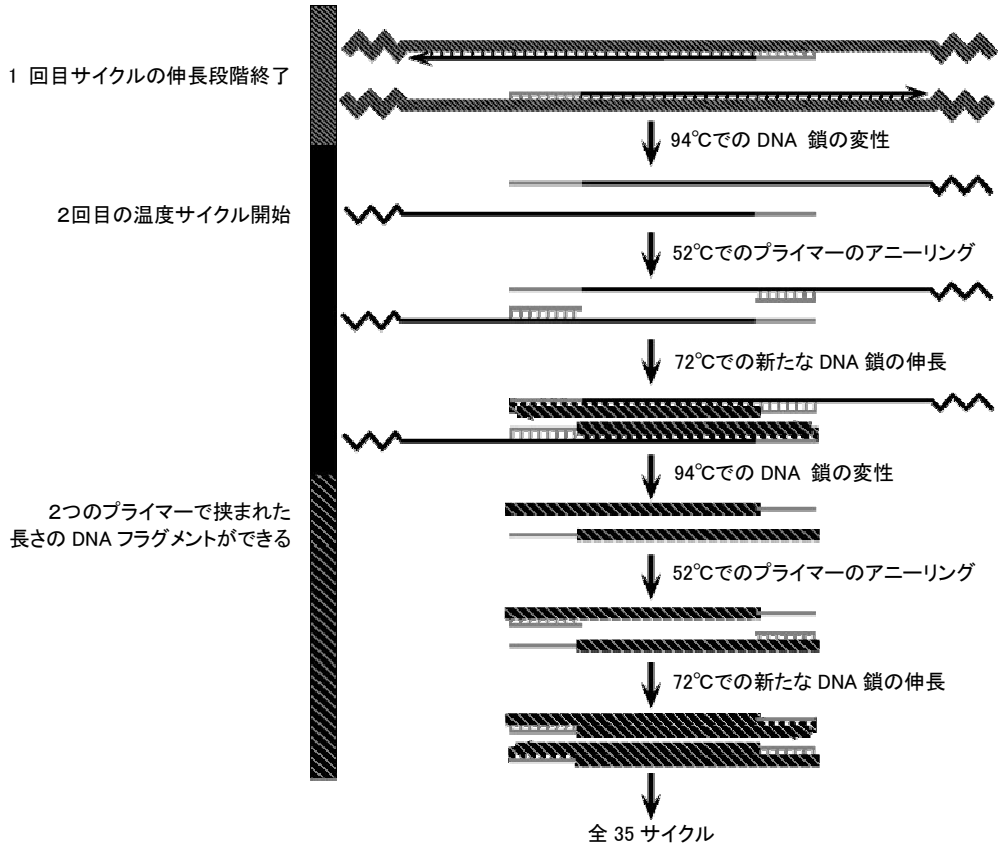


Fig.17. 3回目の温度サイクルで初めてターゲットとしている長さの DNA フラグメントが作らます

指数関数的に増幅されるのはこのプライマーで挟まれた長さの鋳型DNA鎖です(X、X＝もとの鋳型の数、n＝サイクル数)。決して完全には複製されることのない、もともとの長いDNA分子は常に一組だけ存在します。各々の温度サイクルの後、2 つの中間の長さの DNA 鎖が合成されますが、この DNA 鎖も指数関数的には増幅されません。なぜなら、これはもとの鋳型からしか合成できないからです。ですから、もし 1 つの 2 本鎖 DNA 分子に対して 20 サイクルの増幅を行った場合は、もとの鋳型ゲノム DNA 鎖が 1 つ、中間長の鋳型鎖が 20、そして 1048555 個の正確な長さの複製産物が得られるわけです。40 サイクルの後には、もとの鋳型ゲノム DNA 鎖が 1 つ、中間長の鋳型鎖が 40、1.1×10^{12} 個の正確な長さの複製産物が得られるわけです(次頁、Fig.18 参照)。

Fig.18. プライマーで挟まれた長さの DNA だけが指数関数的に増幅される

付録 B 科学捜査の歴史概略

＜検査スピードか識別能力か＞

今は一般的に DNA という証拠をもとに、個人識別を行っていますが、科学技術が発達する以前から犯罪鑑識員は容疑者を犯行現場の証拠と結び付けるという任務を負っていました。例えば容疑者の自動車の中で発見された 泥だらけの靴が、犯行現場に残された足跡と同じであった、または容疑者の家で見つかったビニール袋が被害者の家で見つかったものと同じであったというように、多くの場合、関連づけは間接的におこなわれていました。こうした物的証拠はそれ自体では示唆に過ぎない、 つまりこうしたものはその容疑者が犯行現場にいたということを証明していることにはならないのです。容疑者の何かが残っていてその人物を犯行現場に直接結び付けられることが必要なのです。生物学的証拠がその重要なカギとなります。

＜血液型判定＞

最初の遺伝学的捜査は DNA と全く関係のない、血液型によるものでした。血液グループ、すなわち血液型に A、B、AB および O の 4 種類があります。血液型の検査はきわめて迅速に簡単にできます。ただし、日本人の場合、人口のおよそ 40%は A 型、およそ 30%は B 型であるため、絞り込んだ容疑者の多くが A 型や B 型であるということになると、特に有効な捜査法ではなくなります。血液型判定は容疑者ではないと思われる人を除外する場合に使用したほうが便利です。もし犯行現場に犯人が A 型の血液を残していて、犠牲者が A 型ではない場合、血液型が B、AB および O 型の容疑者は除外できる、というわけです。

＜RFLP＞

Restriction Fragment Length Polymorphism（制限酵素断片長多型）、すなわち RFLP は長年に渡って科学捜査の DNA プロファイリングに役立つ方法として使用されています。RFLP はイングランド人遺伝学者アレック・ジェフリースが 1985 年に最初に報告した方法で、人間のゲノムの特定領域には相互に何回も繰り返している DNA 配列がある（Variable Number of Tandem Repeats、縦列反復配列の反復数、VNTR）、という事実を利用しています。ジェフリースはどのような特定の部位でもリピート数は人によって異なることを発見しました。DNA の特異的な部分を切断する制限酵素を利用して、ジェフリースは VNTR を切り出し、そのサイズを直接比較することに成功しました。リピートが検出される遺伝子座（すなわち対立遺伝子マーカー）は、父親または母親のいずれに由来する、ある繰り返しパターンであることが確認されたのです。実際、RFLP が最初に法的に適用されたのは、家族関係が関わるイギリスの移民訴訟でした。

RFLP は非常に有効な手段であり高い識別能力を持ちますが、手間がかかり、自動化できないため解析に多くの時間を必要とします。比較的サイズの大きい DNA 配列（最小でも数百の塩基対）を分析するため、DNA は少なくともある程度品質が維持されており、分解していないことが必要となります。そのため DNA サンプルが古くなるとこの方法には適していないこともあります。最大の欠点は、大量の DNA を必要とすることです（数十マイクログラム単位）。このため、たった 1 本の髪の毛しか容疑者を暗示するものがないような、多くの犯罪捜査には適していません。

＜STR＞

ショートタンデムリピート(Short Tandem Repeats)も、何回も DNA 配列が繰り返されている DNA の領域をコードすることから、VNTR に似ています。しかし STR ではリピートのサイズが小さくなっており、時にはリピート部分はヌクレオチド 2 個だけのこともあります。VNTR のように人間は誰でも STR パターンを親から受け継いでいます。遺伝子座ごとに母親からの STR 対立遺伝子 1 個と父親からの STR 対立遺伝子 1 個を持ちます。

STR は RFLP より分析がはるかに簡単です。第 1 に、小型であるため、PCR での増幅が容易です。第 2 に、PCR で増幅できるため、STR 検査は自動化が可能であり、通常は多くの検査（10 件以上）を同時に分析できます。PCR を使用した一連の実験にかかる時間は約 4 時間ですが、これに対して RFLP は数日間かかります。第 3 に、DNA が分解してしまっていてもほとんどの場合良好な結果が得られます。そして最後に、たった 1 片の髪の毛であっても遺伝子分析を充分におこなえるだけの遺伝子材料が手に入ります。こうした特性はいずれも注目に値しますが、STR 分析が極めて有効とされているのは、STR を含む多くの遺伝子座を同時に分析できるからです。1 つの検査では最高で 2000 人に 1 人の人を識別す

ることができます。13 という少数の座位の分析により、世界中のどのような 2 人の人物でも（一卵性双生児を除いては）生死にかかわらず識別が可能となります。

興味深いことに、STRs はこれまで調べられている全ての生物種に存在しているのです。現在では、ある特定の種（イヌや競走馬など）の血統の解明に STR 分析を利用するようになり、系統解析は、特に米国では大きなビジネスとなっています。

＜DNA プロファイリング：次の手法は?＞

たくさんの新しい手法が現在開発されており、ミトコンドリア DNA（mtDNA）はその中でも注目されている分野です。mtDNA は DNA と違って核内に存在しないため、染色体 DNA と同じ遺伝の法則には従いません。実際、mtDNA は母親側から遺伝することが一般的に知られています。mtDNA は 2 本鎖の環状構造であることが明らかになっています。mtDNA にはクレブス回路（呼吸回路）に関係する遺伝子が多く含まれており、こうした遺伝子は主にミトコンドリア内部で機能します。形状が環状であるのが原因なのか、ミトコンドリア DNA は染色体 DNA よりはるかに安定です。科学捜査では mtDNA を「最終手段」とすることも多いのですが、どのような分析でも実施する前に、多くの場合まずその品質を確認します。mtDNA が分解していれば染色体 DNA も分解している可能性が非常に高くなるからです。

mtDNA はコピー数が多いので科学捜査に利用することができます。核内遺伝子には細胞 1 個につきコピーは 2 個（両方の親から）しかありませんが、細胞質 mtDNA のコピー数は細胞 1 個あたり数百もあり、使える材料が限られている場合であっても、分子生物学的分析のサンプルとして用いることができる可能性がずっと高くなります。

mtDNA の遺伝子は代謝に不可欠であるため、ヒト間では変異がほとんどないであろうと推定されていました。しかしミトコンドリア DNA の塩基配列を決定し、ヒト集団間で比較した最近の研究からは、mtDNA には人によって著しく異なる「高度変異」領域があることがわかりました。こうした領域は多くの科学捜査での利用の有用性が認識されており、mtDNA 分析を専門とした企業もいくつかあります。mtDNA は、特に多数の死者が出た場合や災害現場で、行方不明者の遺体特定に特に役に立っています。最近起こったインド洋津波災害では、犠牲者の特定には STR 分析と mtDNA 分析が組み合わせて利用されました。

Amplified fragment length polymorphism（増幅断片長多型、AFLP）は RFLP の PCR を用いた変法であり、プライマーを用いて断片の配列を選択的に増幅します。信頼性が高く効率的な分子マーカーの検出法です。DNA を制限酵素で切断して特異的配列を作製し、これを PCR で増幅します。AFLP は RFLP より多くの遺伝子座について評価できます。AFLP はまた多数の多型も判定できます。AFLP を利用した検査はコスト効果が高く自動化が可能です。

最後に、1 塩基多型、いわゆる SNPs（Single Nucleotide Polymorphisms）と呼ばれるゲノム配列すなわちゲノムパターンを利用した新しい科学捜査法にも多くの関心が寄せられています。1 塩基多型は基本的にはすべての DNA に存在している単一塩基対の多型のことで、さまざまな系列の SNPs が存在しています。科学捜査上最も用いられる可能性があるのが SSNPs（Silent Single Nucleotide Polymorphisms）、すなわちサイレント 1 塩基多型であり、いかなる遺伝子産物にも、また遺伝子調節にも、影響を及ぼすことがありません。SNPs が優れた遺伝子マーカーであるのにはいくつかの理由があります。

- 他の種類のマーカーに比べて数が多いこと（ある推定では 1 千万以上）
- ゲノム全体にランダムに分布していること
- 2 対立遺伝子（biallelic）であること（これに対して STR には想定される状態が何種類かあります）
- 分布がかなり均一であること

しかし現在、SNPs を科学捜査に用いることにはいくつか欠点もあります。第 1 に SNPs 分析には、現在科学捜査に用いられている他の方法よりも、大量の DNA が必要であることです。第 2 に、13 ヶ所の STR 座位を用いる場合と同様の識別能力を達成するのに、はるかに多くの 2 対立遺伝子の SNPs が必要であることです。これに加えて SNP 分析コストは STR 分析コストよりかなり高くなっています。これらの理由や、現在 STR が科学捜査で普及しており、また有用性も確認されていることから、SNP 分析が将来、ルーチン的分析法として採用される可能性はあまり無いでしょう。

科学捜査における DNA 分析では、スピードとコスト効果、さらに識別能力の間に常にバランスが存在します（Fig.19）。STR 分析は識別能力が高く、数時間で実行可能であるため、現在最も多く採用されている方法です。他の方法は 2 種類の DNA プロファイルを識別する能力に欠けているか、または手間や時間がかかりすぎるかのいずれかですが、科学捜査に利用されないというわけではありません。さらに、ゲノムやミトコンドリアに関する技術の改善や増え続ける情報により、他の方法が STR 分析より一般的に使われるようになる可能性もあります。

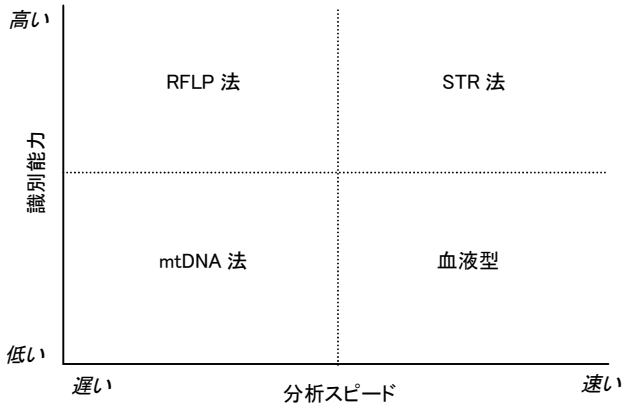


Fig.19 スピードと識別能力による各種科学捜査方法の比較

＜DNA サンプル採取と O.J.シンプソンの事例＞

次の図に示されているように、犯行現場でサンプルを採取すると、実験室に持ち帰って DNA を抽出し、定量し、分析します。次に PCR により分析対象とする特定領域（単数または複数）のコピーを作製します。COIDS システム（Combined DNA Index System 複合 DNA 索引システム。詳細についてはこの付録部分の CODIS データベースを参照してください）では、PCR プライマーはヒトゲノムの別々の 13 ヶ所を増幅するよう設計されています。プライマーセットごとに 1 ヶ所の領域だけを増幅します。各領域、すなわち遺伝子座には、その座位にもよりますがリピート数 8～32 程度の STR が含まれています。1 回の反応で、できるだけ多くのサンプルを最大限分析できるようにするために、こうした試験法を開発した企業は、PCR に使用するプライマーに異なった蛍光タグを用いて標識し、さらに PCR サンプルが蛍光色のみでなくサイズによっても区別できるようなプライマーを作りました。すなわち、サイズが重複する PCR 産物があっても色が同じにはならないのです。

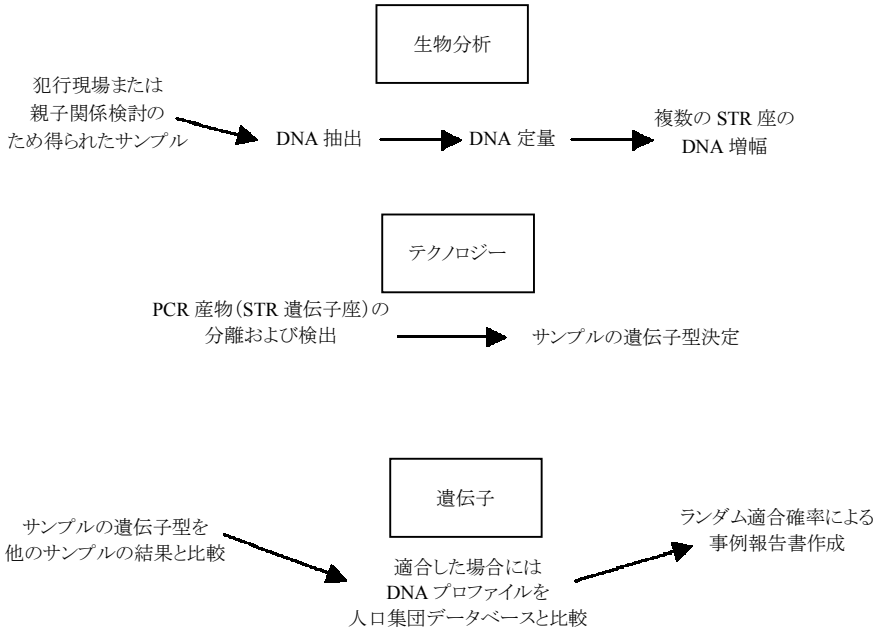


Fig.20 科学捜査における DNA サンプル処理段階について [7]

PCR 反応が終了した後、PCR 産物をアクリルアミドゲルでサイズによって分離し、蛍光発色物を検出します。 DNA プロファイリングに用いる代表的なゲルの例が、7 ヶ所の座位について試験した Fig.21 です。検出すべき PCR 産物はきわめて小さいため、最適な解像度を得るにはアクリルアミドの優れた分離能力が必要なのです。PCR 産物の蛍光発色が確認できたら、その産物を自動的にアレルラダー(サイズ指標)と比較し、そのサイズおよび色によってアレルラダーに適合する PCR 産物を個別に同定するようプログラムが組んであります。次にこのプログラムは試験した遺伝子座ごとに、サンプルごとの遺伝子型、すなわち DNA プロファイルを指定します。

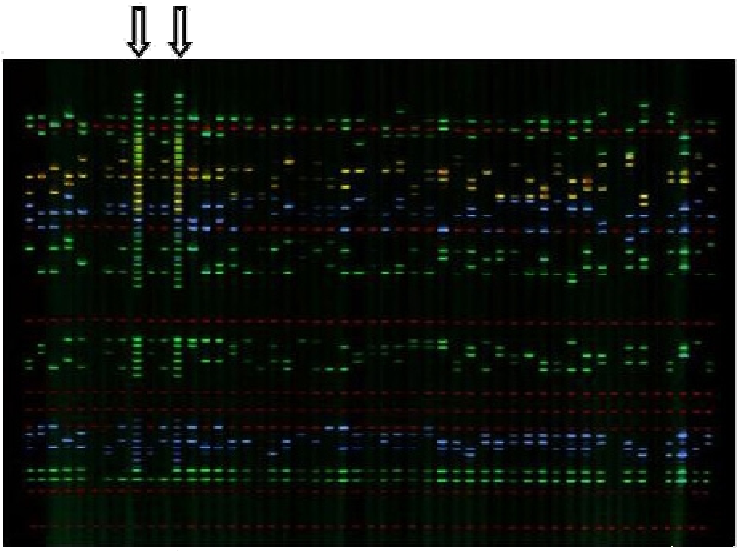


Fig.21 代表的な STR ゲル。増幅した 7 ヶ所の座位の同定に 4 種類の異なった蛍光タグが用いられています。アレルラダー(マーカー)は矢印↓で示してあります。

次にこの DNA プロファイルを他のサンプルと比較します。科学捜査の場合、犯行現場から得たサンプルを多くの容疑者から得たサンプルと比較することを意味します。もしそのサンプルが適合しなければ、それらの容疑者は捜査からは除外されます。適合すれば捜査に加えられます。この時点で、捜査に加えた DNA プロファイルをデータベース（例えば米国の例；STRbase www.strbase.org にあるようなデータベース）と比較し、その遺伝子型が特定の人種グループに多いかどうかを把握して、ランダムに適合する確率をさらに正確に推定できるようにします。一般的には、ランダム適合確率によって、その特定集団の誰かがまったく同じ遺伝子型である確率がわかります。この話題について詳しくは付録Cをご覧ください。

DNA 検査技術は進歩し続けており、ごくわずかな量のサンプルからとった DNA でも分析が可能となっていることから、サンプルを適正に採取することがさらに重要となります。もし犯行現場から証拠を採集しているときにくしゃみなどしてしまったら、自分自身が殺人捜査の重要容疑者となってしまう可能性があるかもしれません。証拠品の採取とサンプル処理は、どのような捜査でも最も外部の影響を受けやすく、証拠が最もコンタミネーションしやすいのです。コンタミネーションしてしまうと、サンプルは純粋でなくなります。犯行現場では多くの場合サンプルには混入物があることを念頭に置いておく必要があります。ホテルのシナリオを思い出してください。犯行が起こる前にすでに多くの人がその部屋には泊まっていて、DNA 証拠を確実に残していると思われます。DNA という証拠に関して言えば、コンタミネーションとはすなわち、同一サンプル中に 1 種類以上の DNA 型が存在している（犯行の種類にもよりますが、可能性はあります）か、またはその DNA はすでに分析を妨害するような何らかの物質に曝されてしまっていることを意味しています。いずれの状況であっても分析には大きな影響が考えられます。DNA という証拠で結論が得られない場合、法廷での審判への影響は非常に大きいこともあります。このために警察は DNA プロファイリングのための証拠物件採取には特に注意を払います。

1. 常に手袋を着用すること。誰もが皮膚細胞を常に落としており、そこから DNA を含む細胞を得ることができます。DNA プロファイリングの主材料として必要な細胞はほんの 2-3 個です。手袋をすれば容疑物件採取時のコンタミネーションを防ぐことができます。

2. 髪は後でまとめるか、または覆います。すでに述べたように、毛髪 1 本だけで誰かがある特別な場所にいたことを充分に暗示することができるのです。

3. くしゃみやせきをすると細胞を証拠物件に対してばらまくことになるので、ほとんどの場合はマスクをします。

4. 犯行現場そして証拠物件が他の場所から事件現場に移されたことで誤った関連性が導かれることのないように扱わねばなりません。ある事件では、犠牲者の遺体を家の中にあった毛布で包んでしまいました。この過ちにより、犠牲者から見つかった毛髪は、その犯行を犯した犯人との接触の証拠なのか、または偶然その犠牲者に付いただけなのかを判断することができなかったため、証拠として役立たなくなってしまいました。

こうした証拠採取プロセスが犯罪捜査にいかに影響するかの一例として、O.J.シンプソンの判例を見てみましょう。

1995 年、ニコール・ブラウン・シンプソンとその友人のロン・ゴールドマンはニコールの家で殺されているのが発見されました。ニコールの前夫 O.J.シンプソンが最重要容疑者となりました。かなりの量の証拠物件が O.J.シンプソンと犯行現場との関連性を示し、DNA プロファイリング（RFLP と STR による両方の方法）が用いられて、ニコールの家と O.J.シンプソンの家から検出された多くの血痕の DNA プロファイルが作製されました。法廷で検討された 45 の血痕のうち、すべてがこの 2 名の犠牲者か、または O.J.シンプソンに由来することがわかりました（9）。しかしこのような確かな証拠があるにもかかわらず、O.J.シンプソンは無罪となりました。著名な犯罪学者であるヘンリー・リー博士が、犯行現場のサンプルの取扱に過失があったと証言したことで、証拠に対する疑義を陪審に植え付けたのです。さらに、この事例は DNA という証拠が採用され始めた初期の、そして注目を浴びていた判例であったため、検察側 DNA プロファイリングに関係する複雑な手順の説明に、証言時間の多くを割きました。

弁護側は、最初のサンプル採取がいかにいいかげんであったか、または誰かが意図的に証拠を操作したとする疑いを充分に陪審員に印象付けることができました。弁護側の攻撃のほとんどは一人の警察官に集中し、その警 察官に偏見があったために被告を犯行と関連付けるような証拠を意図的に植えつけたと主張しました。警察官が証拠物件の扱いを誤ったかもしれないという可能性だけでも、陪審員が無罪判定と判断するには充分だったのです。DNA プロファイリングはこの

ような問題もありましたが、この事件以降も数え切れないほどの判例に用いられています。1983 年にケルヴィン・ジョンソンがレイプと強盗で告発され有罪判決となりましたが、DNA という証拠により犯人ではないことがわかったため、現在では放免されています。DNA プロファイリングは法廷外でも、親子関係の調停や、多くの災害にまきこまれた人々の識別に使用されています。以下のリストに科学捜査におけるこれまでの歩みを示します。

「法医学的 DNA 分析におけるこれまでの歩み」

年	事柄
1985	アレック・ジェフリースが複数座位の RFLP プローブを開発
1988	FBI が単独座位 RFLP を使用した作業を開始
1990	単独座位 STR を用いた PCR 分析が始まる
1992	FBI が DQA1 座位を用いた STR 作業を開始
1994	DNA 鑑別法：国内 DNA データベースの設立を規定
1995	O.J. シンプソンの裁判が DNA という証拠に対する民衆の関心を集める
1996	FBI が mtDNA の検討を開始：最初のマルチ STR キットが利用可能となる
1997	核心的な 13 の STR 座位が定められた
1998	FBI が CODIS データベース開始：スイス航空墜落事故 ― STR による DNA プロファイリングによりすべての遺体が特定された
2001	ニューヨーク世界貿易センタービル爆破 ― DNA プロファイリングの各種方法の組み合わせにより多くの遺体が特定された（8）
2004	カリフォルニア州議会第 69 議案：州 DNA データベース設立案。州議会案は 62%の投票で可決された（14）
2004	インド洋大津波：インターポールおよびその他の国際機関が DNA プロファイリングを用いて犠牲者を特定

＜CODIS システムおよび DNA データベース－米国の場合＞

DNA という証拠の収集と大量蓄積は、法執行に大いに役立つ可能性を秘めています。CODIS、すなわち Combined DNA Index System は、US 全土にまたがった規模の犯罪の現場および有罪となった暴力犯罪者から得られた DNA のデータベースです。CODIS は連邦、州および地域レベルで DNA プロファイルを得て保管します（13）。DNA プロファイルはすべて地域レベルで採取し、次に州レベルおよび連邦レベルへと送られます。

CODIS は US 全土レベルで管理されるものの、地域における DNA 証拠採取を禁止するかどうかの法律の制定は州に権限があります。CODIS は暴力犯罪者に関する情報収集のために考案されましたが、現在では多くの州が、その人物が罪を犯していなくても DNA という証拠収集を許可する法律を制定しています。

カリフォルニア州では議案 69 号で、何らかの重犯罪または性犯罪の有罪判決を受けた者からの DNA 採取を求めています（14）。またこの議案は、各種暴力犯罪または重犯罪で逮捕されたまたは告発された者からの DNA 採取も求めています。この議案に賛成する支持者は、カリフォルニア州には総括的な DNA データベースがないために未解決となっている暴力犯罪が多すぎる、と主張しています。さらに、このデータベースの情報からは個人に関する病気などはわからないので、医学的なプライバシーが侵害されることにはならない、と指摘しています。

しかし反対者等は、有罪判決を受けてはいない者からも DNA 採取をすることに異論を唱えています。プライバシーの保護が適切ではないこと、および無罪の人物の情報を除去する申請に対して州が対応することに消極的である、と考えています。モラルを欠いた係官が 1 人でもいれば、数え切れない人々のプライバシーの権利が損なわれる可能性もあると多くの人が感じています。これは議論の多い領域であり、引き続き検討と開発が行われています。

＜CODIS は実際にはどのように役立っているのしょうか?＞

CODIS では、ヒトのゲノム全体に均一に分布している 13 の遺伝子座、すなわち指標を検討します。選択される遺伝子座およびその相対的位置について、以下の Fig.22 に示します。

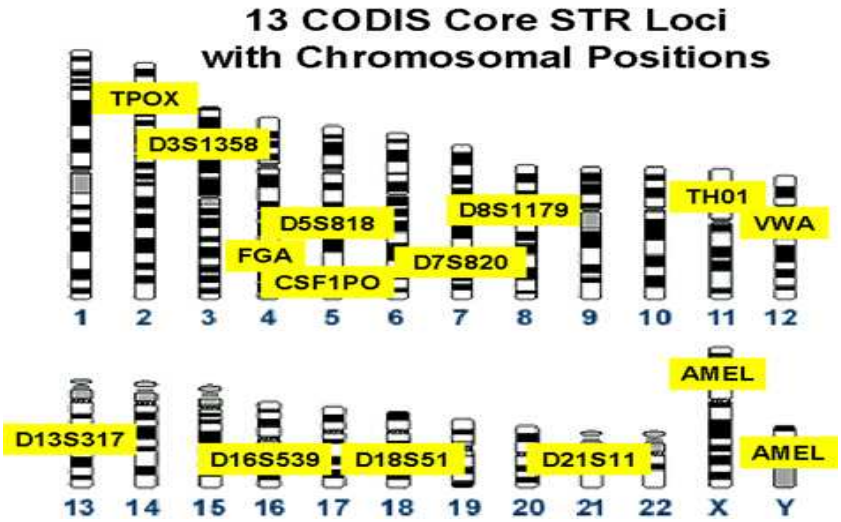


Fig.22 CODIS の主要な STR 遺伝子座 13 ヶ所の遺伝子上の位置（7）

科学捜査では STR のプロファイリングに用いられる 13 ヶ所の遺伝子座に加えて、アメロゲニン座位も分析します。 この遺伝子座における PCR 産物からは X および Y に特有のサイズの異なる PCR 産物が得られます。従ってアメロゲニン座位からは DNA サンプルを採取したヒトの性別についての情報をえることができます。

これら 13 ヶ所の座位の重要な特長は、これらは注意深く選択されているため、プロファイリングの対象となる人物の医学的症状や健康についての情報はわからないことです。すなわち、こうした座位は病気や状態に関連性が無いことがわかっているヒトゲノム領域にあるということです。このような理由から、これらは「匿名」マーカーと呼ばれています。

＜なぜ遺伝子座を 13 ヶ所選択するのでしょうか?＞

どのような組み合わせであっても 2 人の人物の DNA プロファイルを識別する能力は、どれだけ多くの遺伝子座を検討するかによって高くなります。遺伝子座を 1 ヶ所だけ検討した場合、同じ遺伝子型であると考えられる人の数は多いため、2 人の人物間の違いを見分けるのはきわめて困難となります。調査の対象となっている人種グループにもよりますが、識別能力は 1 ヶ所の座位を使った場合、200 人に 1 人程度であると言われています。検討に加える座位が多いほど、2 人の人間のプロファイルを識別する能力は高くなります。次の仮想上の DNA プロファイルを見てみましょう。リストにあるのはコーカサス系アメリカ人（白人）種の STR DNA プロファイルで特定された対立遺伝子、そしてこうした対立遺伝子のコーカサス系アメリカ人（白人）種における頻度です（3）。最後の欄は遺伝子座ごとおよび遺伝子型を合同した場合のランダム適合確率（RMP：付録 C に詳しく説明します）です。この RMP から同じ遺伝子型を持つ確率がわかります。この特定の遺伝子型では、他に同じ遺伝子型を持つコーカサス系アメリカ人（白人）種の人物がいる確率は 500 兆分の 1 であることがわかります。この地球上の人口は現在せいぜい 65 億人程度ですから、実に識別能力が高い数字ですね!

仮想上の DNA プロファイル: ランダム適合確率（Random Match Probabilities）

STR 遺伝子座	特定された対立遺伝子（＝STRs 繰返し数）	コーカサス系白人におけるアレル頻度	遺伝子型頻度
TPOX	8	0.535	
	12	0.041	0.044
D3S158	16	0.222	
	17	0.222	0.099
FGA	21	0.185	
	23	0.134	0.050
CSF1PO	11	0.301	
	13	0.096	0.058
D8S1179	16	0.031	0.001
TH01	10	0.008	0.000
VWA	15	0.082	0.007
D18S51	14	0.137	
	19	0.038	0.010
D21S11	28	0.159	
	29	0.195	0.062
全体の RPM			5.17×10^{-14}

米国では13ヶ所の座位が選択されています。13の座位によるRMPを合計すれば、一卵性双生児を除いては、世界に存在する2人の人物間の違いを充分に見分けられる高い識別能力が得られます。英国では法執行には座位は10ヶ所のみが選択されていますが、これでは場合によっては、2 人の人間が同じ遺伝子型であると同定される状況も生まれる可能性があります。

＜植物および昆虫の遺伝子型分析＞

犯罪捜査に関係する DNA プロファイリングのほとんどは、その犯行に関係している人物のプロファイリングです。しかしDNA プロファイリングは、証拠物件を既知の場所または時期に関連付ける上で、植物または昆虫の固有の遺伝子型が役立つような場合にもおこなわれています。例えば、絶滅の危機にある植物種や動物種の密輸は、現在も世界中多くの場所で横行しています。動物や植物を具体的に特定するために、これまでに説明した方法と同じような検査法がたくさん利用されています。

昆虫の研究を犯罪事例に応用することは、殺人事件や野生動物密猟の捜査を専門とした分野です。昆虫は人間の死亡後ほどなくして集団発生し、その増殖状況を予測することができます。これまでに説明した方法を利用して昆虫を識別することにより、昆虫学者は遺体の死亡後の経過時間と共に、傷害部位の位置などのその他の要因、およびその遺体を移動したかどうかについても推定することができます。

付録 C　STR 対立遺伝子頻度とランダムに適合する確率（RMP）を用いての実習

演習 1：STR 対立遺伝子の遺伝のシミュレーションと識別能力

演習 2：ランダムに適合する確率

パワーポイントによる発表、講義に関する情報および STR プロファイリングのための図については

http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/

を参考にしてください。

演習 1：STR の遺伝および分析のシミュレーション

Crime Scene Investigator PCR Basics キットは、一般的に科学捜査における遺伝子型分析に用いられている 1 つの遺伝子座の遺伝子型分析を、生徒が体験することができるように考案されています。実際の科学捜査では、何種類かの座位で DNA プロファイリングをおこなって、捜査の識別能力を向上させます。簡潔に言えば、この識別能力は、個人間を区別する判別能力のことです。プロファイリングの対象となる座位の数が多い方が、識別する能力はより高くなります。

この考え方について、授業中に簡単な演習をして体験することができます。全生徒に起立してもらい、仮想上の犯罪で想定される容疑者の集団であると仮定します。犯人が犯行現場から走り去るのを見た目撃者がいて、その様子を説明したとします。証人が提供する捜査情報が多ければ多いほど、容疑者集団から除外される人数は多く、そして容疑者集団に加わっている容疑者数が少なくなることを実感するでしょう。先生が捜査情報を少しずつ提供し、容疑者の条件に該当しなくなった時点で生徒には着席してもらいます。生徒 1 名だけが起立している状態になるまで、先生がこの過程を繰り返すと（下記に示した情報内容の案から選択しますが、容疑者集団から生徒が減ってゆくような順番で情報を提供します）、最終的に容疑者は 1 名となります。目撃者が提供する種類の情報には例えば次のような内容があります。

犯人は青色のデニムジーンズをはいていた。
犯人は文字が書いてある T シャツ（またはトレーナー、季節により異なります）を着ていた。
犯人はめがねをしていた。
犯人の髪の色は＿ だった。
犯人の髪の長さはとても短かった、または長かった。
犯人は男性だった、または女性だった。

そして最後に生徒に質問を投げかけます。

「このことで[（名前）]が犯人だということが証明できるでしょうか? 証明できる場合なぜできると考えられますか？もしくは犯人であることを証明できないのしょうか?」

この質問に対する解答は、最後に立っている生徒が犯行を犯した可能性はあるものの、これと同じ情報内容に適合した別の人物がいたのかどうかを考慮する必要がある、ということです。言い換えれば、もう 1 人別の人物がまったく同じ特徴である確率はどの程度あるか、ということになります。同様の考え方が DNA プロファイリングにも必要とされます。ランダムに選択した人物が容疑者とまったく同じ DNA 型である確率はどの程度なのか? このようなランダムに適合する確率こそ、犯行の解明に DNA という証拠を用いる重要な要素なのです。

逃亡している犯人の身体的特徴にさらに目撃された情報を加えれば、正しい人物を有罪（または無罪）であると特定できる可能性は高くなります。まったく同じように、DNA プロファイリングをする遺伝子座位の数が多いほど、犯罪解決のためのより強力な手段とすることができます。

米国では 13 ヶ所の STR 座位を使って、科学捜査が行われ、CODIS と呼ばれている国内データベースに記載されています。この 13 ヶ所全部が分析された場合の平均的なランダムに適合する確率は、1 兆人に 1 人よりも小さくなります。世界人口は全部で約 65 億人であるということから、理論的には CODIS システムなら、一卵性双生児は別として、2 人の人物の違いを区別できるということを意味しています。

次の演習は、4 ヶ所の座位における STR 対立遺伝子の遺伝について証明し、親を同じくする子供であってもプロファイルは異なることを示すものです。モデルとして使用している 4 ヶ所の STR 座位は実際に科学捜査に利用されているものです。

遺伝子座の名	染色体	対立遺伝子範囲(リピート数)
VWA(青)	12	10～24
D8(緑)	8	8～19
D5(黄)	5	7～16
TH01(赤)	11	3～14

授業に必要な材料

・小型の紙袋 8 枚
・赤、青、緑、黄色のブロックまたは厚紙の小さい四角い板(生徒 1 名につき各色 2 つずつ)
・生徒用のワークシート、透明なマスターシートまたは黒板などに表を写したもの

授業前の先生の準備

・青いブロックの 1/4 に VWA の対立遺伝子(13)を、次の 1/4 には対立遺伝子(18)を、3 番目の 1/4 にはまた別の対立遺伝子(16)を、そして最後の 1/4 には別の対立遺伝子(20)をマーカーで記しておきます。記入したマーカーは種類ごとに分けておきます。対立遺伝子のセット 2 つを「母親、VWA」と記入した紙袋に入れます。残りの 2 つのセットは「父親、VWA」と記入した紙袋に入れます。

・緑のブロックで D8 対立遺伝子(8、12、9、13)として同じようにします。対立遺伝子のセット 2 つを「母親、D8」と記入した紙袋に入れます。残りの 2 つのセットは「父親、D8」と記入した紙袋に入れます。

・黄色いブロックで D5 対立遺伝子(7、11、10、12)として同じようにします。対立遺伝子のセット 2 つを「母親、D5」と記入した紙袋に入れます。残りの 2 つのセットは「父親、D5」と記入した紙袋に入れます。

・赤のブロックで TH01 対立遺伝子(7、11、10、12)として同じようにします。対立遺伝子のセット 2 つを「母親、TH01」と記入した紙袋に入れます。残りの 2 つのセットは「父親、TH01」と記入した紙袋に入れます。

授業で行うこと

1. 1 人の生徒を家族の「お母さん」、もう 1 名を「お父さん」とします。お母さん役が「母親」と記した袋 4 個を持ち、お父さん役が「父親」と書いた袋 4 個を持ちます。お父さん役とお母さん役は 4 ヶ所の STR 座ごとに自分達の遺伝子型を選びます。生徒はこれを自分のデータシートに記入します。

2. 各生徒は、母親役の持っている袋と父親役の袋からランダムに対立遺伝子を 1 つ選ぶことで自分の STR 遺伝子型が「遺伝」により伝えられます。生徒ごとに自分のデータを黒板または透明なマスターシートに記入し、どの生徒もそのデータを自分のワークシートに写します。クラスの中の生徒ごとに繰り返すことにより、父親と母親を同じにする子供たちの大「家族」ができあがりました。

表 1. STR の遺伝と分析シミュレーション 生徒用ワークシート

家族の遺伝子型:名前と親および子供の遺伝子型を記入すること

遺伝子座	VWA		D8		D5		TH01	
	母親から	父親から	母親から	父親から	母親から	父親から	母親から	父親から
母親								
父親								
子供 A								
子供 B								
子供 C								
子供 D								
子供 E								
子供 F								

問 1:VWA 対立遺伝子のみを考えた場合、自分と同じ遺伝子型を持つ兄弟姉妹は何人いますか?

問 2:VWA および D8 を考えた場合、自分と同じ遺伝子型を持つ兄弟姉妹は何人いますか?

問 3:VWA、D8 および D5 を考えた場合、自分と同じ遺伝子型を持つ兄弟姉妹は何人いますか?

問 4:VWA、D8、D5 および TH01 を考えた場合、自分と同じ遺伝子型を持つ兄弟姉妹は何人いますか?

問 5:自分が得た結果は、科学捜査における DNA プロファイリングに用いられる識別能力増加の原則をどのように実証していますか?

問 6:遺伝子型が同じ子供が 2 人以上いるとしたら、どのような説明が考えられますか?

演習 2:ランダムに適合する確率

法医学的 DNA プロファイリングに用いられる遺伝子座はそれぞれが異なる染色体上にあるため、互いに独立して遺伝されます(これにはメンデルの「独立の法則」により説明される遺伝原則です)。この事実により科学捜査官は、どのような DNA プロファイルでも、個々の対立遺伝子頻度を掛け算して積を求める方法を用いることができます。言い換えればこれは、ある集団からランダムに選ばれたもう一人の人物がまったく同じ遺伝子型である確率であり、ランダムに適合する確率(RMP)としても知られています。

$$RMP = f(VWA) \times f(D8) \times f(D5) \times f(TH01)$$

ここで f(…)は集団内のその遺伝子型頻度を意味しています。例えば、対立遺伝子 A1、A2 の対立遺伝子頻度を p、q とすると、遺伝子型頻度は Hardy-Weinberg の式より、以下のように示されます。

遺伝子型	A1	A2
A1	A1A1 p^2	A1A2 2pq
A2	A1A2 2pq	A2A2 q^2

Hardy-Weinberg の式 ; $p^2 + 2pq + q^2 = 1$
$f(A1A1) = p^2$, $f(A1A2) = 2pq$, $f(A2A2) = q^2$

ホモザイゴスであるA1A1の遺伝子型頻度 f(A)は p^2、ヘテロザイゴスであるA1A2の遺伝子型頻度は 2pq と計算します。

これは基本的には、ある所定の集団における特定対立遺伝子の相対的存在度の測定値を現しています。CODIS の 13 ヶ所の STR 座位についての対立遺伝子頻度は、公開されている多くのデータベースに報告されています。

そのデータベースと上記の遺伝子頻度の式を考慮して、次の作業をしてみましょう。

今回のこの演習のためにインターネットで STRBase(http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase)にアクセス、 Data from NIST US Population SamplesT(少し画面をスクロールするとあります)を選択してみましょう。次に Allele Frequencies published in the Journal of Forensic Science をクリックして解説を開きます。表 1 はコーカサス系アメリカ人(白人)集団の対立遺伝子頻度、表 2 はアフリカ系アメリカ人(黒人)での頻度、表 3 はスペイン系アメリカ人の頻度を示しています。

日本では人種が日本人がほとんどであり、またこのようなデータがまだありませんので、授業では米国でのデータを利用します。

上記の表を利用して、各集団から演習で使った対立遺伝子ごとの頻度を記入して次の表を完成させてください。

遺伝子座	VWA		D8		D5		TH01	
自分の遺伝子型								
頻度								
コーカサス系白人 (Caucasians)								
黒人(African Americans)								
イスパニア系 (Hispanics)								

問 1：集団間の対立遺伝子頻度についてどのようなことに気がつきましたか? 何か傾向はありますか?

問 2：科学捜査による遺伝子型分析結果の多くは、特定集団に関する RMP を報告しています。そのことが重要となる理由について、自分の作成した表のデータを用いて説明してください。ヒント：適合する確率（RMP）は、容疑者と遺伝子型が同じである潜在的容疑者は何人くらい見つかるのかについて、ある程度の指標を示すのに用いられることを思い出してください。

問 3：表のデータを用いて自分の遺伝子型の、集団ごとの RMP を計算してください。自分の対立遺伝子の頻度を RMP の公式に挿入して計算してください。

・自分の対立遺伝子頻度を挿入した RMP 公式を書く

・コーカサス系アメリカ 人（白人）集団として計算する

・アフリカ系アメリカ人（黒人）として計算する

・スペイン系アメリカ人アメリカ人として計算する

考察における質問

1. 犯人のものであることがわかっている血痕が犯行現場に残されており、これが採取されてCODISの13ヶ所の遺伝子座について分析されたと想定します。まだ容疑者は逮捕されておらず、また捜査上の適切な手がかりもないとします。容疑者の人種の特定にあたりCODISの13ヶ所の遺伝子座の遺伝子型分析を採用すべきだと思いますか? STRBaseの表から学び取った内容を用いて自分の見解を裏づけてください。

2. 人種にもとづいた集団調査結果を使用する場合、どのようなことが問題となるでしょうか?

付録 D　PCR と無菌操作

PCR は非常に微量の DNA から大量の DNA を合成出来る、強力で敏感な方法です。そのため PCR 反応に不要な DNA が混入する可能性は常に考慮する必要があります。そのため、サンプルがお互いに混じりあわないようにいつも充分に気をつけなければなりません。

このような汚染による実験の失敗を防ぐ方法を記します。

1. フィルター型のピペットチップ

マイクロピペットの筒の末端は気化した DNA によって簡単に汚染されます。末端にフィルターのついたピペットチップはエアロゾルによるマイクロピペットの汚染を防ぎます。マイクロピペット中の DNA 分子はフィルターを通過できないので、PCR 反応を汚染する事はありません。キットに含まれているチップは、PCR 用として最適なピペットチップです。

2. 試薬を分注する

同じ試薬を用い、同じ反応液に何回もピペットで試薬を入れるのは、PCR 反応液を汚染する可能性が非常に高くなります。出来る限り、各々のグループあるいは生徒に対して、試薬は細かく分注してください。もし分注した反応液が汚染されても、細かく分注していれば汚染される PCR 反応の数は最小限で済むはずです。

3. ピペットチップを替える

試薬を初めてとるときは、必ずピペットチップを替えましょう。ピペットチップを何回も使用すると、チップの外についている汚染 DNA 分子が他の溶液に入り込み、それが PCR 反応を汚染します。もし、自分のチップがきれいかどうかわからない場合は、それを捨てて新しいものに替える方が良いでしょう。新しいチップに交換してかかるお金は、反応が失敗する事によってかかるお金よりずっと少ないのです。

4. 適切な無菌操作

マイクロチューブを開ける、分注する、あるいは試薬を取り出すときには、フタを開ける時間は最小限にしてください。マイクロチューブを開け放しにし空気に曝露する事で、空気中に存在する気化した DNA や口や息等に存在する DNA や DNA 分解酵素によって簡単に汚染されてしまいます。手際よく反応液をとりだして、取り出し終わったら直ぐにフタをしめましょう。また、フタやそれの縁を持ってマイクロチューブを扱うことは避けましょう。これは、指についた DNA による汚染を防ぐためです。

5. 使用する装置や作業領域を滅菌する

10%漂白剤で DNA を破壊できます。10%漂白剤で表面部やピペットの筒部分を拭いたりすることで、DNA コンタミネーションの発生を防止できます。

付録 E 用語の解説

Allele、対立遺伝子（アレル）— 遺伝子指標の一種、遺伝子座。

Annealing、アニーリング — オリゴヌクレオチドプライマーをテンプレート（鋳型）となる DNA 鎖の相補的配列に結合すること。

CODIS — Combined DNA Index System（複合 DNA 索引システム）。犯行現場および有害判決を受けた暴力事件被告から得た DNA の米国の連邦レベルで管理されているデータベース。

Cofactors、コファクター — 酵素が正しく機能するのに必要なイオンまたは低分子物質。例えば、TaqDNA ポリメラーゼは正しく機能するのに Mg^{2+}イオンを必要とするので、Mg^{2+}イオンはこの場合、コファクターである。

Denature、変性 — 相補的な 2 本の DNA 成分を分離融解させるプロセス。体内では変性は酵素によっておこなわれますが、PCR では変性は熱によっておこなわれます。

dNTPs — DNA 合成に用いられる 4 種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）の一般的略称。

Ethidium bromide、エチジウムブロマイド —紫外線光に曝露されると蛍光を生じる、DNA 塩基対間に挿入される蛍光色素分子。

Eukaryotes、真核生物 — 遺伝物質（DNA）を含む膜のある核を有する細胞で構成されている生物。

Exon、エキソン — 転写されたメッセンジャーRNA 分子の部分で、相互にスプライシングされ、核を離れてタンパク質配列に翻訳されます。

Extension、伸長 — Taq ポリメラーゼが dNTPs（デオキシリボヌクレオチド三リン酸） **—** dATP、dTTP、dCTP または dGTP をオリゴヌクレオチドプライマーに付加することをいいます。伸長は塩基対形成の規則に従い、5' から 3' 方向に進みます。

Genome、ゲノム — ある 1 人の人間の核にあるすべての遺伝子構成。

Genomic DNA、ゲノム DNA — 細胞の核内に認められる DNA 全体を示します。

Genotype、遺伝子型（ジェノタイプ） — どんな対立遺伝子がどのような組み合わせで存在するかを表している。

Intron、イントロン — 転写されたメッセンジャーRNA 分子の部分で、スプライシングによって mRNA から切り捨てられ、タンパク質配列には翻訳されない部分。

Locus、遺伝子座（ローカス） — 遺伝子指標。遺伝子座とは染色体上の位置をいい、遺伝子に関係ある場合も、ない場合もある。（複数形は loci）

Lysis、細胞溶解 — 細胞を破裂させて内容物を放出させるプロセス。

Master Mix、マスターミックス — PCR 反応の主役となる溶液で、テンプレートとなる DNA 以外の反応に必要なすべての成分（dNTPs、プライマー、バッファー、塩、ポリメラーゼ、マグネシウム）が含まれている。

Nucleotides、ヌクレオチド — DNA または RNA の基本単位。糖（デオキシリボースまたはリボース）、リン酸、及び窒素塩基（アデニン、チミン、シトシン、グアニン、RNA の場合はチミンの代わりにウラシル）で構成されている。

Oligonucleotide、オリゴヌクレオチド — 一般的には少数のヌクレオチドで構成されている DNA または RNA 分子。プライマーの項参照。

PCR — ポリメラーゼ連鎖反応。試験管内で DNA の増幅するプロセス。

Polymorphism、**多型** — 文字上は「多くの形」を意味する。多型とは、ある特定の遺伝子座位における遺伝子の違いのこと。人によって単一の座位が多型であり、何種類かの異なった対立遺伝子がある。

Power of Discrimination、**識別能力** — 2 種類の遺伝子型間を識別する能力。識別能力は分析する座位の数が多いほど向上する。

Primers、**プライマー** — 標的となる DNA 配列上の特定のヌクレオチド配列に結合する短いヌクレオチド（通常は 3 ～30 塩基対の長さ）。PCR 用のプライマーは一般的に実験室で合成される。オリゴヌクレオチドの項も参照。

Reagents、**試薬** — 実験を実行するのに必要な材料。通常は溶液であるか、または各種溶液の混合物。

Restriction Fragment Length Polymorphism（RFLP）、**制限酵素断片長多型** — VNTR の識別に用いられる DNA 検査の際の手法。DNA を酵素で消化し、対象とする DNA 領域に結合するプローブを用いて特定の配列を分析する。

STR — ショートタンデムリピート（塩基対短反復配列）、すなわち極めて短い DNA 配列の繰り返し。繰り返しはヌクレオチド 2～4 個しかない場合もある。STR は遺伝によって伝えられ、人によって、また遺伝子座によって異なる。STR は一般的に用いられる PCR を利用した DNA 分析の根本原理。

TaqDNA polymerase、TaqDNA **ポリメラーゼ** — 耐熱バクテリア *Thermus aquaticus* から分離された熱に安定な DNA ポリメラーゼ。この DNA ポリメラーゼが PCR には一般的に用いられている。

Template、**テンプレート** — オリゴヌクレオチドプライマーが標的とする配列を含んでおり、相補的成分に複写される DNA 成分。

Variable Number of Tandem Repeats（VNTRs）、**反復配列多型** — 長い繰り返し成分で構成される DNA 配列。DNA 成分の繰り返しは塩基対数千個におよぶ場合もある。VNTR は遺伝によって伝えられ、人によって、また遺伝子座によって異なる。

付録 F　先生用回答ガイド

◆はじめに

1. 犯行現場から得られたどのような証拠品に DNA が含まれている可能性がありますか？
そして犯行現場のどのようなところに、そうした証拠を見つけることができると思いますか?

あらゆる種類の生物材料 ― 例えば血液、唾液、皮膚、毛髪または骨などがあります。こうした材料は飲み物用のコップ（唾液）、ヘアブラシまたは歯ブラシ（毛髪および皮膚）、また血痕などに見つかります。

2. 犯行現場から得られた DNA で、なぜ PCR を行う必要があるのでしょうか?

犯行現場で得られる証拠から抽出できる DNA の量は一般的にごくわずかです。分析に必要な充分量の DNA を複製するために PCR を行います。

3. 証拠から抽出された DNA を、PCR を行わずにゲル電気泳動をするとその結果はどうなりますか？

おそらく何もわからないでしょう。証拠から抽出された DNA は少なすぎるため、ほとんどの場合は最初に何らかの操作（例えば PCR）をしないと検出できません。

4. 遺伝子型とは何ですか?

生物個体の表現形質に対応する遺伝的背景の型のことです。一般にどんな対立遺伝子がどのような組み合わせで存在するかを表しています。

5. 対立遺伝子と遺伝子座の違いは何ですか?

遺伝子座とは染色体上の特定の位置をいいます。対立遺伝子とは個々の遺伝子座の、特定の変異のことをいいます。

6. 科学捜査ではなぜ遺伝子ではなく非コード化 DNA を分析するのでしょうか?

非コード化DNAには遺伝子の発現パターンに関する情報は含まれていないため、科学捜査に用いられます。 こうした配列は親族関係に関する情報しか提供せず、ある人物の生物学的状況（例えば、健康状態、精神衛生の状態、または身体の状況など）については何もわからないことから、法医学会での合意により、科学捜査に用いるのが適切であると考えられています。

Lesson 1

1. PCR では DNA を用いてどのようなことができますか?

PCR により、分析に充分な量の DNA を複製することができます。

2. PCR をおこなうにはどのような材料が必要ですか?

テンプレート（鋳型）、DNA ポリメラーゼ酵素、ヌクレオチド（dNTPs）、プライマー、およびバッファー（Tris、塩などが含まれる）など。

3. マスターミックスとは何ですか? また各成分はなぜ必要なのでしょうか?

・Taq ポリメラーゼ ― 熱に対する感受性が低いポリメラーゼ。デオキシヌクレオチド三リン酸を相互に「縫い合わせて」テンプレートに相補的な新しい DNA 鎖を作ります。

・デオキシヌクレオチド三リン酸、ATCG ― 相補的成分を作るのに用いられます。

・プライマー ― 増幅をしたい DNA に対して相補的な短い配列の DNA。順方向と逆方向の 2 種類があります。増幅中の DNA 配列では塩基対によって隔てられています。PCR 産物のサイズは、DNA の増幅された領域のサイズとプライマーにある塩基類の数の合計となります。

・バッファーおよびコファクター ― 反応が指摘速度で起こるようにするために必要です。

4. 犯行現場から得られた証拠である DNA で PCR を行う必要があるのはなぜですか?

犯行現場から得られた DNA は分析にも可視化するにも量が不充分であることが多いため PCR が必要なのです。

5. PCR のサイクルはどのような段階で構成されていますか? また各段階ではどのようなことが起こるのでしょうか?

PCR の各サイクルは 3 段階で構成されています。
・変性 ― DNA2 本鎖がほどかれ、1 本鎖に分かれます。
・アニーリング ― プライマーが DNA の相補的配列に結合します。
・伸長 ― DNA ポリメラーゼがプライマーにヌクレオチドを付加して DNA を伸長させていきます。

Lesson 2

1. DNA はなぜアガロースゲル内を移動するのでしょうか?

DNA はマイナス荷電しているため、電流によって分離が可能です。実際、電気泳動とは「電流で移動する」という意味です。電流がゲルに流されたときに DNA が移動します。ゲルはバッファーに浸してあるため、電流はバッファーとゲルを通って流れ、マイナスに荷電した DNA をプラス側の陽極に運びます。

2. この実験で DNA プロファイルを作製するのに用いられている 2 つの実験手法は何ですか?またそれぞれが果たす機能はどのようなものですか?

DNA プロファイルを作るのに PCR とゲル電気泳動が用いられています。PCR は分析に充分な量の DNA サンプル量を増幅するのに用います。ゲル電気泳動はサイズに従ってバンドを分離します。バンドが分離したらゲルを染色し、バンドパターンを可視化します。ゲルのバンドを標準パターン(アレルラダー)と比較してそのサイズを推定することができます。

3. アレルラダーとは何ですか? DNA プロファイリングではどのような役割を果たしますか?

アレルラダーとは、ある特定の遺伝子座で想定される対立遺伝子の混合物のことです。このアレルラダーは犯行現場で得られた証拠中に存在している PCR 産物(対立遺伝子)の同定に必要です。

4. 電気泳動の後で DNA を可視化するには何が必要ですか?

DNA はゲルを染色液に漬けて可視化します。この演習では Fast Blast DNA 染色液を用いています。これはゲル中に存

在している DNA を濃い青色に変えます。

Lesson 3

1. どのサンプルからも PCR 産物ができましたか? もしできなかった場合にはその理由を考え、説明してみましょう。

できなかった場合は次の理由が考えられます。

・長期間保存により DNA が分解した。
鋳型となる DNA が分解してしまい PCR 反応で増幅しない可能性があります。

・サンプルにコンタミネーションが起こった。
ピペットチップの先端を触ったり、マイクロチューブを開けた状態でしゃべったりすることで、手の汚れや唾がサンプルに混入することがあります。それによって DNA が分解してしまう可能性が考えられます。

・試薬の調製を間違った。
反応に必要な試薬が 1 つでも抜けると PCR 反応は正常に行われません。

2. 自分の各サンプルの遺伝子型は何ですか?

アレルラダーと比較し、遺伝子型を特定しましょう。

3. 犯行現場の DNA サンプルの遺伝子型はいずれかの容疑者の遺伝子型と一致しますか? 一致する場合、どの容疑者と一致していますか?

はい。容疑者 C の遺伝子型が容疑者の DNA サンプルと一致します。

4. この結果から、どの容疑者を捜査に加え、また除外するべきですか？その根拠も説明してみましょう。

容疑者 C は犯行現場で見つかった DNA サンプルと同じ遺伝子型であることから、容疑者 C が捜査に加えられます。容疑者 A、B および D の遺伝子型は犯行現場で見つかった DNA サンプルとは同じではないため、容疑者ではないとして捜査から除外されます。

5. TH01 座における各対立遺伝子は、サイコロのある 1 つの目が出現する確率と同じ考え方ができると想定します。TH01 座位にある想定される対立遺伝子は 8 個です。集団内においていずれか 1 つの対立遺伝子が出現する確立はどれくらいでしょうか?

対立遺伝子が 8 個あり、ある集団内での出現頻度がまったく同じであるとわかっている場合、1 つの対立遺伝子の頻度は 1/8 となります。

6. メンデルの独立の法則と上記問題 5 の想定をもとにすると、犯行現場で採取したサンプルの遺伝子型頻度はどの程度でしょうか？

問題 5 の想定を前提とすると、各対立遺伝子の頻度は 1/8 です。メンデルの独立の法則では、対立遺伝子の頻度を掛け算することで、単一座位における遺伝子型の頻度が得られるとしています。電気泳動では 2 本のバンド＝2 個 の対立遺伝子か確認されていますので、各対立遺伝子頻度を掛け算すると、この遺伝子型の頻度は、

1/8×1/8=1/64 となります。

7. 容疑者が 13 名おり、うち 1 名のみが犯行現場で検出された TH01 座に適合する遺伝子型があることがわかったと仮定します。TH01 座位について算出された遺伝子型のみを元にして犯人を特定することは適当であると 思いますか? その根拠を説明してみましょう。

容疑者が 13 名おり、うち 1 名だけ TH01 座位の遺伝子型が犯行現場で見つかったものと同じであった場合、当然その人物が犯人であると確信できるかも知れません。容疑者と遺伝子型が同じであるのは 64 人に 1 人であることがわかっています。しかし、今回検査した容疑者は 13 名だけだったのです。そんな条件下で、遺伝子型が一致したということはかなり高い確率でその人物が犯人である可能性が高いことになります。しかし、訴訟事実を強力にするには、得られた遺伝子型の証拠以外に、目撃者、容疑者が犯行現場に残した物理的証拠、動機などが必要となります。

付録 G 付録 C 演習問題の解答

演習 1

問 1：VWA 対立遺伝子のみを考えた場合、自分と同じ遺伝子型を持つ兄弟姉妹は何人いますか?

問 2：VWA および D8 を考えた場合、自分と同じ遺伝子型を持つ兄弟姉妹は何人いますか?

問 3：VWA、D8 および D5 を考えた場合、自分と同じ遺伝子型を持つ兄弟姉妹は何人いますか?

問 4：VWA、D8、D5 および TH01 を考えた場合、自分と同じ遺伝子型を持つ兄弟姉妹は何人いますか?

問題ごとに、別の座位を遺伝子型に加えてゆくと、親を同じとする同じ遺伝子型の子供の数、すなわち問題ごとに答える生徒の数が減ってゆくはずです。一卵性の子供の正確な数や、減ってゆく場合のパターンは、生徒によって、また授業によって異なりますが、全体として減ってゆくことには変わりはありません。

問 5：自分が得た結果は、科学捜査 DNA プロファイリングに用いられる識別能力増加の原則をどのように実証していますか?

検討する遺伝子座位の数が多いほど、容疑者となる人数は減ってゆきます。

問 6：遺伝子型が同じ子供が 2 人以上いるとしたら、どのような説明が考えられますか?

・一卵性双生児
・偶然。遺伝子座が 4 ヶ所だけの場合には、このことが考えられます。座位の数が多いほど偶然一致する可能性はだんだん減ってゆきます。
・クローン人間だった!?科学的にはありえますが、倫理的にクローン人間を作成することは禁じられています。

演習 2

問 1：集団間の対立遺伝子頻度についてどのようなことに気がつきましたか? 何か傾向はありますか?

対立遺伝子頻度は人種集団によって異なる場合があります。特に具体的な傾向はありません。

問 2：科学捜査による遺伝子型分析結果の多くは、特定集団に関する RMP を報告しています。そのことが重要となる理由について、自分の作成した表のデータを用いて説明してください。ヒント：適合する確率（RMP）は、容疑者と遺伝子型が同じである潜在的容疑者は何人くらい見つかるのかについて、ある程度の指標を示すのに用いられることを思い出してください。

ランダムに適合する確率は集団によって異なります。RMP は調査対象の人物と同じ人種に最も高い関連性があり、比較には適切な対照集団が用いられていることを知っておくことが重要です。

問 3：表のデータを用いて自分の遺伝子型の、集団ごとの RMP を計算してください。自分の対立遺伝子の頻度を RMP の公式に挿入して計算してください。

公式を使って計算してみましょう。

考察における質問

1. **犯人のものであることがわかっている血痕が犯行現場に残されており、これを採取して CODIS の 13 ヶ所の遺伝子座について分析したと想定します。まだ容疑者は逮捕されておらず、また捜査上の有力な手がかりもないとします。容疑者の人種の特定にあたり CODIS の 13 ヶ所の遺伝子座の遺伝子型分析を採用すべきだと思いますか? STRBase の表から学んだ内容を用いて自分の見解を裏づけてください。**

   CODIS の 13 ヶ所の座位における遺伝子型は、容疑者の人種推定には用いるべきではありません。具体的な人種集団を正しく特定できる対立遺伝子はないからです。

2. **人種にもとづいた集団調査結果を使用する場合、どのようなことが問題となるでしょうか?**

   ・ある人物の人種を誰が特定するか?
   ほとんどの調査ではその人物自身によって人種が特定されており、人種に関する自己認識はその生物学的特長や遺伝子的履歴を性格に反映していることも、そうでない場合もあります。

   ・さまざまな人種の混血人については、人種をどのように判断するか?
   人種の特定が明確にできる場合であっても、起源とする集団が地理的に隔離されていると対立遺伝子頻度に何らかの差が生じることもあります。例えばコーカサス系アメリカ人(白人)の場合、北部ヨーロッパ出身者は南部ヨーロッパ出身者とは対立遺伝子頻度が異なることも考えられます。

付録 H 参考文献

1. Benecke M, DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey, Naturwissenschaften 84, 181–188 (1997)

2. Butler JM, Forensic DNA Typing, Academic Press, San Diego (2001)

3. Butler JM et al., Allele frequencies for 15 autosomal STR loci on U.S. Caucasian, African American, and Hispanic populations, *J Forensic Sci.* **48**, 908–911 (2003)

4. Byrd, M, DNA, The Next Generation Technology is Here, http://www.crime-scene-investigator.net/DNA.html

5. Crime Scene Investigation (gateway site to information about crime scene investigation, education, jobs, and more), http://www.crime-scene-investigator.net/

6. DNA Typing and Identification, http://faculty.ncwc.edu/toconnor/425/425lect15.htm

7. ENFSI DNA WG STR Population Database, www.strbase.org

8. Leclair B et al., Kinship analysis and human identification in mass disasters: the use of MDKAP for the World Trade Center tragedy, Genetic Identity Conference Proceedings: Thirteenth International Symposium on Human Identification (2002)

9. OJ Simpson trial evidence, http://www.law.umkc.edu/faculty/projects/ftrials/Simpson/DNA.htm

10. Short tandem repeat DNA Internet database: Biology and Technology Behind STR Markers, http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/

11. Strengths, Limitations and Controversies of DNA Testing, http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/medgen/DNAtesting/DNAtest_pcs.html

12. Thieman WJ and Palladino MA, Chapter 8: DNA fingerprinting and forensic analysis, pp 169–184 in Introduction to Biotechnology, Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco (2004)

13. US Dept. of Justice, Federal Bureau of Investigation. The FBI's Combined DNA Index System Program (CODIS), http://www.fbi.gov/hq/lab/codis

14. Voter Information Guide. California Proposition 69: DNA Samples, http://voterguide.ss.ca.gov/propositions/prop69-title.htm

Careers in Forensic Sciences

Lorenz K, Think You Want to Be a CSI? http://msn.careerbuilder.com/Custom/MSN/CareerAdvice/456.htm?siteid=cbmsnhm4441&sc_extcmp=JS_cj1_jan05_hotmail1&GT1=5938

US Department of Justice, Office of Justice Programs, National Institute of Justice, Education and Training in Forensic Science: A Guide for Forensic Science Laboratories, Educational Institutions, and Students, June 2004, http://www.ojp.usdoj.gov/nij/pubs-sum/203099.htm

バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
本社　〒116-0014 東京都品川区東品川 2-2-24
Tel : 03-6361-7000　Fax : 03-5463-8480
大阪　〒532-0025 大阪市淀川区新北野 1-14-11
Tel : 06-6308-6568　Fax : 06-6308-3064
福岡　〒812-0013 福岡市博多区博多駅東 2-5-28
Tel : 092-475-4856　Fax : 092-475-4858

製品の学術的なお問い合わせ
修理・メンテナンスに関するお問い合わせは
Tel : 03-6404-0331　Fax : 03-6404-0334
Mail : life_ps_jp@bio-rad.com

http://explorer.bio-rad.co.jp

M4569 1303D